



TESIS DOCTORAL

"Aspectos toxicocinéticos de la intoxicación con *Heterophyllaea pustulata* y su efecto sobre la proliferación y muerte celular en la epidermis de cabras"

M.V. Juan Francisco Micheloud

Director:

Dr. Eduardo Juan Gimeno

Co-director:

Dra. Susana C. Núñez Montoya

"Aspectos toxicocinéticos de la intoxicación con *Heterophyllaea pustulata* y su efecto sobre la proliferación y muerte celular en la epidermis de cabras".

Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de DOCTOR EN
CIENCIAS VETERINARIAS
Año 2019.

Tesista:

MV Juan Francisco Micheloud

Director:

Dr. Eduardo Juan Gimeno

Co-director:

Dra. Susana Carolina Núñez Montoya

Lugares de Trabajo:

- Laboratorio Análisis de Imágenes y Laboratorio de Patología "Dr. Bernardo Epstein", FCV - UNLP
- Grupo de Trabajo de Patología, Epidemiología e Investigación Diagnóstica. Área de Sanidad Animal-IIACS Leales/INTA-Salta.
- Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), CONICET y Farmacognosia, Dpto. Ciencias Farmacéuticas, Facultad Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

2

Comité evaluador:

- Dr. Hugo Héctor Ortega.
- Dra. Nora Mestorino.
- Dr. Pedro Horacio González.

A mis abuelos, por ser ejemplo de perseverancia, trabajo y honestidad.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, por todo el amor y apoyo brindado siempre.

A mi compañera en este camino de la vida. Gracias Negra, por ese amor incondicional que me contiene cada día al llegar a casa.

A mis "padres académicos", Ana María Canal y Eduardo Eliseo Baroni por su apoyo y confianza en los inicios de mi carrera.

A mi director de tesis, Eduardo Juan Gimeno, por haber confiado en mí. Por esas largas charlas y consejos que me han servido para transitar esta etapa y me dan ánimos para emprender la siguiente.

A Susana Carolina Núñez-Montoya por abrirme las puertas de su laboratorio y aceptar este desafío que presentó algunos momentos difíciles.

4

A todo el grupo de patología de la Universidad Nacional de La Plata por haberme contenido y ayudado durante el tiempo que pase allí.

A todos los integrantes del laboratorio de Farmacognosia del Dpto. Cs. Farmacéuticas, Facultad Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina por su ayuda y contención.

A mis compañeros de trabajo en INTA y la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Católica de Salta por su apoyo.

A todos los "maestros" que he tenido a lo largo de mi carrera, los de la Facultad, los del INTA y otros tantos que de una u otra forma han contribuido a mi formación humana y profesional. Un agradecimiento especial al grupo de Salud Animal de INTA Balcarce donde tuve mis primeras experiencias en la institución donde hoy me desempeño. Fundamentalmente a Ernesto Odriozola y Carlos Campero, por sus consejos y charlas, que me han servido de mucho para mi desarrollo profesional y personal.

A la Dra. Olga G. Martínez, por confiar en mí, por abrirme las puertas de su laboratorio y el Herbario del Museo de Ciencias Naturales de Salta; por ayudarme a comprender un poco más el maravilloso mundo de la botánica.

A Claudio Barbeito, Luciana Cholich, Agustín Martínez por sus contribuciones en la escritura de esta tesis.

A los pasantes y alumnos que han pasado por mí laboratorio durante estos años; compañeros de largas horas de trabajo. Gracias por la paciencia y esa energía que cada día me ayuda a ser mejor. Gracias especialmente a Luis Colque-Caro que contribuyó directamente en la realización de este ensayo, y a Tomas Lewis quien dibujó, desinteresadamente, la tapa de esta tesis.

Al Instituto de Patobiología de INTA Castelar, especialmente a Fernando Delgado y Claudia Moreno, por ayudarme con el procesamiento histológico de parte de las muestras.

A mis compañeros del laboratorio de Patología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Esperanza, especialmente a Rocio, Amorina y Alejo, por acompañarme en mis inicios, apoyarme siempre y ayudarme a ser mejor diariamente. Sin el grupo donde me inicie, esta historia hoy no sería la misma.

A los colegas y productores que hacen uso de nuestro "Servicio Especializado de Diagnóstico", gracias por confiar en nosotros y por ayudarnos a ser mejores día a día.

6

Al tambo caprino de INTA Salta, especialmente a Marcela Martínez, por proveerme los animales para el ensayo. Además a Emilio Alfaro y José Alfaro por su ayuda durante la etapa experimental.

A los diferentes organismos del Estado Nacional Argentino que han hecho posible, mediante la financiación de este trabajo, mi formación profesional. Específicamente a la Beca de Formación de Posgrado de INTA y al Proyecto Específico 1115055 INTA "Enfermedades parasitarias, infecciosas y tóxicas de los Pequeños Rumiantes". Además, al Consejo de Investigaciones de la UCASAL por haber financiado parte del ensayo para esta tesis.

-INDICE GENERAL

- I- Resumen**
- II- Abstract**
- III- Índice de tablas**
- IV- Índice de figuras**
- V- Abreviaturas**
- VI- Introducción.**
 - 1. Fotosensibilización.
 - 2. Las plantas como fotosensibilizantes.
 - 3. *Heterophyllaea pustulata* como especie tóxica.
 - 4. Dermatopatología en la fotosensibilización.
 - 5. Bibliografía.
- VII- Hipótesis.**
- VIII-Objetivos.**
 - 1. Objetivo general.
 - 2. Objetivos específicos.
- IX- Aspectos clínico-patológicos de la intoxicación por *H. pustulata*.**
 - 1. Introducción
 - 2. Materiales y métodos
 - 3. Resultados
 - 4. Discusión y conclusiones.
 - 5. Bibliografía.
- X- Aspectos dermatopatológicos de la intoxicación por *H. pustulata*.**
 - 1- Introducción
 - 2- Materiales y métodos
 - 3- Resultados
 - 4- Discusión y conclusiones.
 - 5- Bibliografía.
- XI- Aspectos toxicocinéticos de la intoxicación por *H. pustulata*.**
 - 1- Introducción
 - 2- Materiales y métodos
 - 3- Resultados
 - 4- Discusión y conclusiones.
 - 5- Bibliografía.
- XII- Conclusión general.**
- XIII- Trabajos y publicaciones logradas.**

I- RESUMEN

Heterophyllaea pustulata Hook f. (Rubiaceae) es una planta fotosensibilizante que produce pérdidas en el Noroeste Argentino. Su efecto tóxico ha sido demostrado en ratones y se identificaron nueve antraquinonas (AQs) con actividad fotodinámica. El presente trabajo de tesis pretendió establecer una correlación toxicocinética entre las principales AQs (rubiadina y soranjidiol), las lesiones histopatológicas y los patrones de proliferación y muerte celular en la epidermis de cabras intoxicadas experimentalmente. Se emplearon 10 cabras adultas que fueron divididas en dos grupos, uno control (GC) y otro tratado (GT). Los animales del GT recibieron hojas y tallos finos secos y molidos de *H. pustulata* a la dosis de 5 g/kg de peso. El GC, por su parte, recibió una dosis similar de heno de alfalfa molido. Se evaluó el perfil hepático, el daño dérmico, la concentración sérica y dérmica de las dos AQs en ambos grupos. Las muestras de piel y sangre se obtuvieron a diferentes tiempos durante 15 días de iniciado el experimento. Los tejidos fueron procesados por las técnicas histológicas de rutina. La detección de rubiadina y soranjidiol en muestras de suero, tejido dérmico y material vegetal se determinó por cromatografía Líquida de Alta Resolución y acoplada a un espectrómetro de masas. Los patrones de proliferación celular se evaluaron mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-PCNA, BAX2 y BCL2 para identificar células en mitosis y

apoptosis respectivamente. Todos los animales del GT expresaron signos clínicos entre las 8-10 h post administración de la planta. Los signos fueron los característicos de un cuadro de fotosensibilización. En cuanto al perfil hepática solo la glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT), la bilirrubina directa (BD) y bilirrubina total (BT)) arrojaron modificaciones durante los primeros 5 días. En concordancia, las AQs (soranjidiol y rubiadina) fueron detectadas en suero de todos los animales del GT a partir de las 8 h post administración, siendo sus niveles máximos entre las 24 y hasta las 72 h para luego descender. En piel no se observaron niveles detectables de ninguna de las AQs bajo estudio. En los estudios histopatológicos, inicialmente, se observaron cambios degenerativos, edema e inflamación. El día 8, la necrosis epidérmica fue intensa y comenzaron los fenómenos de reparación, que incluyeron la proliferación vascular y conjuntiva con hiperplasia epidérmica. La expresión de los antígenos BCL2 y BAX fue máxima entre las 32 y 72 h, mientras que el PCNA aumentó su expresión entre los 8 y 15 días.

Los resultados de este trabajo demuestran que fotosensibilización puede considerarse como una forma acelerada de daño directo de la piel y que rubiadina y soranjidiol son determinantes en la toxicidad de *H. pustulata*.

II- ABSTRACT

Heterophyllaea pustulata Hook f. (Rubiaceae) is a photosensitizing plant that produces losses in the Northwest of Argentina. Its toxic effect has been tested in mice and nine anthraquinones (AQs) with photodynamic activity in the plant were identified. The aims of research work was to establish a toxic-kinetic correlation of the more important AQs present in the plant (rubiadina and soranjidiol), the histopathological lesions, and the proliferation and cell death patterns in the epidermis of experimentally poisoned goats. Ten adult goats were distributed into two groups: one control (CG) and another treated (TG). The TG goats received dry and ground leaves and thin stems of *H. pustulata* at the dose of 5 g / kg of live weight, whereas the CG received a similar dose of milled alfalfa hay. Subsequently, the liver profile, the dermal damage and was evaluated; the serum and dermal concentration of the two AQs in both groups were evaluated. The skin and blood samples were obtained at several times during 15 days after the start of the experiment. The tissues were processed by routine histological techniques. Detection of rubiadin and soranjidiol in serum, skin and plant tissues was done by High Resolution Liquid Chromatography (HPLC) coupled to a Mass spectrometer. Cell proliferation patterns were evaluated by immunohistochemistry with anti-PCNA, BAX2 and BCL2 antibodies to identify cells in mitosis and apoptosis respectively. All

animals of the TG expressed clinical signs between 8-10 h after plant administration. Regarding liver changes, only glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT), direct bilirubin (DB) and total bilirubin (TB) showed values slightly different from normal in the GT, during the first 5 days. In concordance, AQs (soranjidiol and rubiadina) were detected in serum of all the animals of the TG from 8 h and up to 72 h post administration, with maximum levels between 24 and 72 h, and then they were not detected. During experiments, levels of AQs in skin was no detectable. Histopathological studies revealed, initially, degenerative changes, edema and inflammation. On day 8, the epidermal necrosis was intense and repair phenomena began, which included vascular and conjunctive proliferation with epidermal hyperplasia. In agreement, the expression of BCL2 and BAX antigens was higher between 32 and 72 h, whereas the PCNA increased its expression between 8 and 15 days. The results of this work show that photosensitization can be considered as an accelerated form of direct skin damage in which rubiadina and soranjidiol are determinants in the toxicity of *H. pustulata*.

III- INDICE DE TABLAS.

- **Tabla 1-** Variación de diferentes signos clínicos a lo largo del tiempo durante el experimento en animales tratados. Se expresa la gravedad promedio de los 5 animales observados. Cada signo clínico se clasificó y tabuló utilizando la siguiente escala: 0= ausente, 1= leve, 2= moderada y 3= grave.
- **Tabla 2-** Criterios de clasificación empleados de las lesiones histopatológicas en las biopsias de piel.
- **Tabla 3-** Procedencia y condiciones de uso de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados.
- **Tabla 4-** Valores medios de diferentes lesiones histopatológicas en animales tratados (n=5) a lo largo del experimento. Las lesiones se estudiaron semicuantitativamente como 0= ausente, 1= leve, 2= moderado y 3= severo. El grosor de la biopsia representa la medida entre el cartílago y la cara dorsal del pabellón auricular.
- **Tabla 5-** Detección de antraquinonas en suero y piel de cabras intoxicadas con *H. pustulata*.

IV- INDICE DE FIGURAS.

- **Figura.1.** Esquema donde se observan los distintos mecanismos de fotosensibilización inducida por plantas.
- **Figura. 2.** **A-** Planta adulta de *H. pustulata* presente en el área de pastoreo. **B y C-**Detalle de las hojas y la inflorescencia de la planta.
- **Figura.3.** Estructura química de las antraquinonas identificadas en *H. pustulata*.
- **Figura.4.** Variación de diferentes signos clínicos a lo largo del tiempo durante el experimento en animales tratados. **A-** 1 h antes de administrar del tóxico; **B-** 72 h post-administración; **C-** 15 días post-administración.
- **Figura.5.** Variación de las enzimas hepáticas (GGT, GOT, FA), bilirrubina total, directa e indirecta (TB, DB e IB). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos ($p < 0.05$). T0= 1 h antes de administrar del tóxico; T1= 24 h post-administración (p-a); T2= 72 h p-a; T3= 120 h p-a; T4= 192 h p-a.
- **Figura.6.** Hallazgos histológicos. **A-** Imágenes histológicas de hígado en control animal. **B-** Imágenes histológicas del hígado en el animal tratado. (H&E, 40 X).
- **Figura. 7.** Aspecto histopatológico de la piel de cabra normal (0h p-a) H&E 20X.
- **Figura. 8.** Aspecto histopatológico de las biopsias de piel a las 32 h p-a. **A-** Detalle de los cambios epidérmicos y de la presencia de exudado neutrófilo en la unión dermo-epidérmica (H&E, 20x). **B-** Severa infiltración de la dermis. En el inserto se observa la hemorragia perianexal. (H&E, 20x).
- **Figura. 9.** Aspecto histopatológico de las biopsias de piel a las 72 h p-a. **A-** severa degeneración epidérmica con acántosis y formación de vesículas intra-epidérmicas. **B-** Formación de pústulas intra-epidérmicas y severa infiltración dermo-epidérmica. (H&E, 20x).
- **Figura. 10.** Aspecto histopatológico de las biopsias de piel a las 8 días p-a. **A-** Necrosis coagulativa difusa severa de la epidermis (H&E, 20x). **B-** células de quemadura solar ("sun burn cells") en las capas basales

de la epidermis. Inserto con células de quemadura solar con mayor detalle (H&E, 40x).

- **Figura. 11.** Aspecto histopatológico de las biopsias de piel a los 15 días p-a. A- hiperplasia e hiperqueratosis severa con acantosis y formación de "rete pegs". B- formación de trabéculas epiteliales y nidos de células en la dermis profunda (H&E, 20x).
- **Figura. 12.** Expresión del antígeno PCNA, por inmunohistoquímica en epidermis. GT: grupo tratado. GC: Grupo de control. T0= 0 h. T1) 32 h post administración (p-a). T2= 72 h p-a. T3= 8 días p-a. T4= 15 días p-a. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).
- **Figura. 13.** Expresión del antígeno PCNA, por inmunohistoquímica en dermis. GT: grupo tratado. GC: Grupo de control. T0: 0 h. T1: 32 h después de la administración (p-a). T2: 72 h p-a. T3: 8 días p-a. T4: 15 días p-a. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).
- **Figura. 14.** Aspecto histopatológico de las biopsias de piel con PCNA 20X. Secuencia de lesiones observadas: T0= 0 h. T1= 32 h post administración (p-a). T2=72 h p-a. T3=8 días p-a. T4=15 días p-a.
- **Figura.15.** Aspecto histopatológico de las biopsias de piel con BCL2 40X. Secuencias de lesiones observadas: T0=0 h. T1=32 h post administración (p-a). T2= 72 h p-a. T3= 8 días p-a. T4=15 días p-a.
- **Figura. 16.** Expresión del antígeno BCL2, por inmunohistoquímica en epidermis. GT: grupo tratado. GC: Grupo de control. T0= 0 h. T1= 32 h post administración (p-a). T2= 72 h p-a. T3= 8 días p-a. T4= 15 días p-a. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).
- **Figura.17.** Expresión del antígeno BAX, por inmunohistoquímica en epidermis. GT: grupo tratado. GC: Grupo de control. T0= 0 h. T1= 32 h post administración (p-a). T2= 72 h p-a. T3= 8 días p-a. T4= 15 días p-a. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).
- **Figura. 18.** Aspecto histopatológico de las biopsias de piel con BAX 20X. Secuencia de lesiones observadas: T0=0 h. T1=32 h post administración (p-a). T2= 72 h p-a. T3= 8 días p-a. T4= 15 días p-a.

- **Figura. 19.** Cociente entre los niveles de inmuno-marcación entre BAX y BCL2 (BAX/BCL2). GT: grupo tratado. GC: Grupo de control. T0= 0 h. T1= 32 h post administración (p-a). T2= 72 h p-a. T3= 8 días p-a. T4= 15 días p-a. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).
- **Figura. 20.** Variación en la concentración de rubiadina/soranjidiol (%) durante los distintos tiempos de muestreo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

V- ABREVIATURAS.

% P/P= g de compuesto por 100 g de muestra.

¹FS*= Fotosensibilizador en estado singlete electrónicamente excitados.

¹FS₀= Fotosensibilizador en estado fundamental singlete.

¹O₂= Oxígeno singlete.

³FS*= Fotosensibilizador en estado triplete excitado.

³O₂= Oxígeno molecular.

AcOEt= Acetato de etilo.

ADN= Ácido desoxirribonucleico.

AQ/ AQs= Antraquinona/s.

AUP= "Area under the peak" (Área debajo de cada pico).

BAX= "BCL2 Associated X protein".

BCL2= "B-cell lymphoma 2".

BD= Bilirrubina directa.

Ben= Benceno.

BI= Bilirrubina indirecta.

BSA= Albumina sérica Bovina.

BT= Bilirrubina total.

c.s.p.= cantidad suficiente para.

CICUAL= Comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

CLAR= Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

DAD=Detector de Arreglo de Diodos.

ERO= Especies reactivas de oxígeno.

ESI= "Electron Spray Ionization" (Ionización por electro espray)

FA= Fosfatasa alcalina.

FE= Fase estacionaria.

FM= Fase móvil.

FS*= Fotosensibilizador excitado.

FS= Fotosensibilizador.

GC= Grupo control.

GGT= Gamma-glutamyl transferasa.

GOT= Glutamato-oxalacetato transaminasa.

GT= Grupo tratado.

H&E= Hematoxilina y eosina.

H₂O₂= Peróxido de hidrogeno.

HFo= Ácido fórmico.

HO•= Radical hidroxil.

HPLC-DAD-ESI-QTOF= "HPLC with diode-array detector and Mass Spectrometry" (Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos y espectrometría de masa-masa).

HPLC-UV-Vis= High Performance Liquid Chromatography" (Cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta-visible).

IHq= Inmunohistoquímica.

MCNS= Herbario del Museo de Ciencias Naturales de Salta.

MeOH-HPLC= Metanol grado HPLC.

MiliQ= Agua ultrapura.

MS= "Mass Spectrometry" (Espectroscopia de masa).

MSⁿ=Rompimiento Masa-Masa.

MV= Material vegetal.

O₂•⁻ = Anión radical superóxido.

p-a= Post-administración.

PAS= Ácido peryódico de Schiff.

PCNA= "Proliferating cell nuclear antigen" (antígeno de proliferación nuclear)

PS3= Proteína p53.

R²=Coeficiente de correlación.

t_R= Tiempo de retención.

UV= Ultravioleta.

UV-B= Radiación ultravioleta B (315 - 280nm)

VI- INTRODUCCIÓN

VI-1. FOTOSENSIBILIZACIÓN

La fotosensibilización es un proceso caracterizado por reacciones cutáneas adversas; causada por la exposición simultánea a ciertos químicos y a la luz solar, tanto ultravioleta (UV: 200-400 nm) como visible (V: 400-780 nm) (Gallo, 1987; Hussain y col., 2018). Estos agentes químicos reciben el nombre de fotosensibilizadores (FS), ya que en presencia de luz generan una especie excitada (FS*) que por sí misma o por transferencia de electrones o energía a otra sustancia, pueden producir alteraciones en las células a nivel molecular. Sus sitios de acción comunes son el ADN, las membranas celulares, los lisosomas y ribosomas (Sharman y col., 2000).

En términos generales los FS son moléculas orgánicas planas y rígidas, con un alto grado de conjugación aromática (cromóforo) que le confiere una gran deslocalización electrónica que le permite absorber luz (Dai y col., 2012; De Melo y col., 2013, Baltazar y col., 2015). Por lo tanto, los FS generalmente son moléculas altamente coloreadas (pigmentos), ya que el cromóforo es el responsable de su capacidad para absorber luz (Dai y col., 2012, Baltazar y col., 2015, Hamblin, 2016). La presencia de grupos auxocromos (grupos funcionales o cadenas carbonadas) alteran su espectro de absorción y, por lo tanto, de ellos depende en gran medida la longitud de onda de absorción del FS (Dai y col., 2012).

Cuando el FS, en su estado fundamental singlete ($^1\text{FS}_0$, con todos sus electrones con espines apareados y en orbitales de baja energía) es irradiado, absorbe un fotón de luz ($h\nu$) y pasa a un estado singlete electrónicamente excitado ($^1\text{FS}^*$). Luego, para regresar a su estado basal ($^1\text{FS}_0$) lo hace por dos vías de desactivación: fotoquímica o fotofísica (Levine, 1996; Nagy y col., 2010). Cuando emplea "mecanismos fotoquímicos" se generan nuevas especies moleculares por distintas reacciones como disociación, isomerización, ionización, entre otras (Levine, 1996). En contraste, cuando emplea "mecanismos fotofísicos", la molécula permanece químicamente inalterada y para retornar a su estado basal libera energía en forma de calor o a través de procesos radiativos y/o no radiativos (Dai y col., 2012; Baltazar y col., 2015; Hamblin, 2016). En los "procesos radiativos", la energía se libera en forma de radiación electromagnética que implica la emisión de un fotón (luz), mediante la emisión de fluorescencia o fosforescencia. En cambio, en los "procesos no radiativos" no hay emisión de luz, la energía se pierde por relajación vibracional, conversión interna y cruce entre sistemas (Intersystem Crossing) (Dai y col., 2012; Baltazar y col., 2015; Hamblin, 2016). Lo importante es que el FS en su estado singlete excitado ($^1\text{FS}^*$) puede generar por cruce entre sistemas, una especie excitada de menor energía, pero más reactiva y con mayor vida media, identificada como estado triplete excitado ($^3\text{FS}^*$). A partir de este estado,

puede regresar al estado basal emitiendo fosforescencia o reaccionando con moléculas de su entorno, siendo el oxígeno molecular ($^3\text{O}_2$) la principal por su abundancia (Dai y col., 2012; Baltazar y col., 2015; Hamblin, 2016).

En definitiva, los FS en su estado $^3\text{FS}^*$ y en presencia de $^3\text{O}_2$ pueden generar diferentes especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), entre otras (Baltazar y col., 2015; Hamblin, 2016). La producción de estas ERO se conduce a través de dos mecanismos bien definidos que compiten entre sí: Reacción fotodinámica Tipo I y Tipo II (Sharman y col., 2000; Núñez Montoya y col., 2005).

- En la **reacción fotodinámica Tipo I**, el $^3\text{FS}^*$ reacciona con un substrato o con el solvente mediante transferencia de electrones o átomos de hidrógeno para generar radicales o iones radicales del FS, y estos son los que reaccionan con el $^3\text{O}_2$ para producir $\text{O}_2^{\bullet-}$, y, en reacciones posteriores, radical hidroxilo (HO^\bullet) (Núñez Montoya y col., 2005).
- En la **reacción fotodinámica Tipo II**, el $^3\text{FS}^*$ transfiere energía directamente al $^3\text{O}_2$ para formar el estado singlete excitado ($^1\text{O}_2$) y el $^3\text{FS}^*$ regresa a su estado basal inicial (Núñez Montoya y col., 2005).

En definitiva, las ERO generadas en ambas reacciones fotodinámicas ($O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} y 1O_2) pueden oxidar diferentes moléculas biológicas como ácidos grasos insaturados, fosfolípidos, aminoácidos, proteínas, bases púricas y pirimidínicas. De esta manera, las ERO producen la desorganización de la membrana celular, la pérdida de la funcionalidad de las proteínas y daños irreparables en el ADN que pueden conducir a la muerte celular (Sharman y col., 2000), lo cual se traduce en lesiones en los tejidos.

En conclusión, para que exista fotosensibilización es necesaria la concurrencia de al menos dos factores: Radiación y un FS capaz de generar su estado $^3FS^*$ en el organismo, más precisamente en la piel para que sea evidente la entidad, ya que si no puede pasar desapercibida.

23

En este punto, es necesario diferenciarla de la quemadura de sol, donde la piel nada o poco pigmentada de un animal normal, sufre un proceso inflamatorio a continuación de una exposición excesiva a los rayos UV, siguiendo un curso de desarrollo lento, mientras que la fotosensibilización es de desarrollo rápido (Gallo, 1987; Hussain y col., 2018).

Los FS pueden estar presentes en el organismo por distintas vías: a) por la ingesta de plantas o medicamentos que poseen grandes cantidades de sustancias fotosensibilizantes, b) debido a trastornos hepáticos, y c) por alteraciones del metabolismo pigmentario. A su vez, los FS pueden actuar tal

como ingresan al organismo o como productos metabólicos (Gallo, 1987, Tokarnia y col., 2012). Según la etiología de la enfermedad, se reconocen cuatro tipos diferentes de fotosensibilización (Hussain y col., 2018)

1- **Fotosensibilización primaria o Tipo I:** causada por la ingestión de un FS presente en el alimento o administrado como medicamento, ya sea por vía oral o inyectable.

2- **Fotosensibilización hepatógena, secundaria o Tipo II:** Se debe a un daño hepático que impide la normal eliminación de los FS, ya que la mayoría de estas sustancias se eliminan por la bilis al intestino. Al existir alguna alteración o afección hepática que impide la libre eliminación de bilis, ésta difunde al tejido circundante y así llega a la circulación sanguínea junto con los FS, impregnando todo el organismo, y por supuesto la piel. Por tal motivo, en este tipo de fotosensibilización se observa ictericia en los animales.

3- **Fotosensibilización por alteraciones del metabolismo pigmentario o Tipo III:** Se debe a presencia de pigmentos que normalmente están ausentes (porfirinas) o aparecen en cantidades pequeñas en el organismo (hemoglobina). Un ejemplo clásico es la "porfiria congénita", asociada a un defecto en el metabolismo de las porfirinas por deficiencia en la producción de la enzima uroporfirinogeno III cosintetasa, necesaria para

sintetizar hemoglobina; lo cual redunda en la acumulación de uroporfirinas y coproporfirinas que son fotosensibilizantes.

4- **Fotosensibilización idiopática (tipo IV):** En este tipo, la patogenia o el agente fotodinámico es desconocido.

Sea cual fuere el tipo de fotosensibilización, los compuestos fotosensibilizantes circulan en sangre y al ser expuestos a la luz solar se activan generando ERO que dañan las células y por consiguiente los tejidos (Ginn y col., 2007). Estos daños conllevan a la muerte celular a través de dos mecanismos: necrosis o apoptosis.

La necrosis es una muerte celular rápida "No Programada" que involucra un grupo de células y que desencadena procesos inflamatorios (Oniszczyk y col., 2016). En términos generales, se asume que aquellos FS que atacan la membrana celular o se acumulan en lisosomas causan necrosis (Nagy y col., 2010). La muerte por apoptosis está regulada por mecanismos moleculares propios de la célula y ocurre de forma más lenta. En la apoptosis, la membrana permanece sin daños por lo que los componentes intracelulares no se exponen al medio extracelular lo que evita la activación de procesos inflamatorios. Los FS que se acumulan en la mitocondrias o lisosomas pueden generar muerte por apoptosis (Nagy y col., 2010). Asimismo, se cree que, en general, el tipo de mecanismo de muerte se relaciona con la dosis de irradiación a la que se someten los FS. Así,

bajas dosis de radiación pueden generar muerte por apoptosis y altas dosis favorecen la muerte por necrosis (Nagy y col., 2010).

VI-2. LAS PLANTAS COMO AGENTES FOTOSENSIBILIZANTES

Las plantas fotosensibilizantes constituyen un limitado grupo de especies vegetales, capaces de afectar a los animales (Galitzer y Oehme, 1978; Hussain y col., 2018). Se distinguen dos grupos, según el tipo de fotosensibilización que producen (Tokarnia y col., 2002; Tokarnia y col., 2012; Hussain y col., 2018) (Fig. 1):

- 1) **Plantas fotosensibilizantes primarias:** Deben su toxicidad a la presencia de compuestos fotosensibilizantes que la misma planta biosintetiza (Galitzer y Oehme, 1978; Tokarnia y col., 2012).
- 2) **Plantas fotosensibilizantes secundarias o hepatógenas:** Poseen principios tóxicos capaces de lesionar el hígado de los animales, y tras el daño hepático, se produce la acumulación de filoeritrina, pigmento fotosensibilizante derivado de la degradación de la clorofila (Galitzer y Oehme, 1978; Scheie y col., 2002; Scheie y col., 2003).

Las plantas que causan fotosensibilización primaria en animales incluyen un grupo reducido de especies vegetales entre las que se incluyen: *Fagopyrum esculentum* (L) Moench (Polygonaceae) e *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae), las cuales contienen antraquinonas fotodinámicas denominadas

respectivamente fagopirina e hipericina (Smith, 1909; Bruce, 1917; Araya y Ford, 1981; Bourke y White, 2004). Por su parte, *Ammi majus* L. (Apiaceae) (Dollahite y col., 1978), *Thamnosma texana* (Gray) Torr. (Rutaceae) (Oertli y col., 1983; Oertli y col., 1984), *Cymopterus watsonii* (Apiaceae) (Stermitz y Thomas, 1975; Egyed y Williams 1977) y *Cooperia pedunculata* Herb. (Amaryllidaceae) (Casteel y col., 1988; Rowe y Norman, 1989) causan fotosensibilización primaria debido a la presencia de otros compuestos fotodinámicos denominados furocumarinas. Recientemente se ha determinado en Brasil que *Froelichia humboldtiana* Sub. (Amaranthaceae) es una especie vegetal que genera fotosensibilización primaria, aunque se desconoce cuál es el principio activo (Pimentel y col., 2007; Souza y col., 2012)

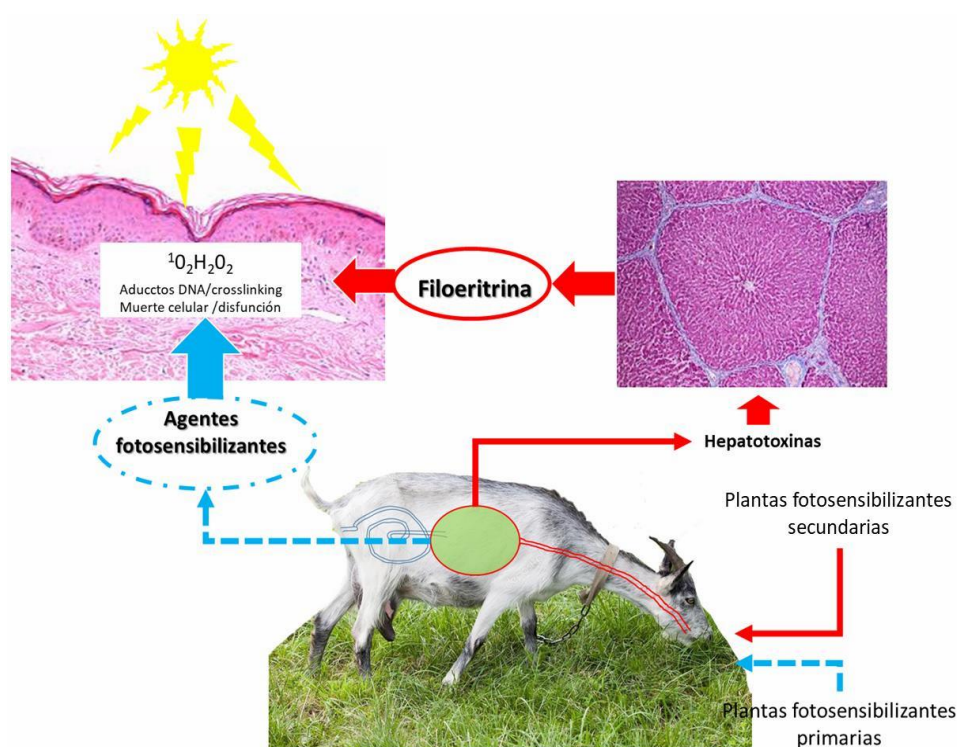


Figura. 1. Esquema donde se observan los distintos mecanismos de fotosensibilización inducida por plantas.

En Argentina, *Ammi majus* es la planta más reconocida como causante de fotosensibilización primaria (Odriozola, 1984; López y Odriozola, 1987). Sin embargo, para el Noroeste de nuestro país, se ha informado en varias ocasiones la intoxicación de equinos, bovinos y caprinos por la ingesta de una planta fototóxica, ya que los efectos nocivos se manifiestan cuando los animales se exponen a la luz solar (Hansen y Martiarena, 1967; Bacigalupo, 1993; Aguirre y Neuman, 2001). Esta especie vegetal denominada *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) es conocida por los lugareños como "cegada", en alusión a uno de los efectos tóxico que produce: ceguera.

Se debe destacar que las plantas tóxicas producen grandes pérdidas en la ganadería a nivel mundial (James y col., 1992; Panter y col., 2002, Riet-Correa y col., 2007), aunque las mismas son difíciles de estimar debido a que no existen datos confiables sobre problemas subclínicos y otras pérdidas indirectas asociadas a ellas (Riet-Correa y Medeiros, 2001). En el oeste de E.E.U.U se estima que las pérdidas anuales debido a plantas tóxicas ascienden a los 340 millones de dólares (Nielsen y James, 1992). En Brasil, solo para el estado de Rio Grande do Sul, se presumen pérdidas superiores a 180.000 dólares debido sólo a las muertes por plantas tóxicas (Riet-Correa y Medeiros, 2001). En Argentina, gran parte de esta información se desconoce y es

probable que las pérdidas económicas por el consumo de plantas tóxicas sean muy importantes en ciertas regiones ([comunicación personal E Odriozola](#)).

VI-3. *Heterophyllaea pustulata* COMO ESPECIE TÓXICA.

Este arbusto (Fig. 2) crece en el ecotono entre bosque montano y pastizal serrano -de altitud superior a los 1.000 metros sobre el nivel del mar- de las provincias argentinas de Jujuy, Salta y Tucumán ([Bacigalupo, 1993](#); [Aguirre y Neuman, 2001](#)). Es la causa de importantes pérdidas económicas en la población rural de la región ([Suarez y col, 2017](#))



Figura. 2. A- Planta adulta de *H. pustulata* presente en el área de pastoreo. B y C-Detalle de las hojas y la inflorescencia de la planta.

Las pérdidas inducidas por *H. pustulata* obedecen principalmente a la imposibilidad de obtener subproductos de los animales intoxicados como carne, leche, quesos, entre otros, que son la base de la economía familiar; a lo que se suma, la muerte de algunos animales, principalmente cabras, por caídas en zonas de serranías ([Comunicación oral con pobladores](#)).

Algunos grupos de investigación han estudiado la intoxicación ocasionada por esta especie vegetal en diferentes animales de experimentación: bovinos, ovinos, conejos, cobayos y ratones ([Hansen y Martiarena, 1967](#), [Aguirre y Neuman, 2001](#); [Núñez Montoya y col., 2008](#)). Hansen y Martiarena (1967) describieron que la ingesta de esta planta produce queratoconjuntivitis (ceguera) y dermatitis, particularmente en animales de capas despigmentadas; y definieron la toxicidad como una reacción de fotosensibilización primaria sin ictericia en su presentación clínica. De esta manera, adjudicaron el efecto tóxico a la presencia de un principio activo fotosensibilizante, que no lograron identificar. Asimismo, describieron daño hepático en conejos; por lo tanto, no se descarta la acción hepatotóxica de esta planta.

Núñez Montoya y col. (2003 y 2006) realizaron el estudio fitoquímico de *H. pustulata*, aislando e identificando como principales metabolitos nueve antraquinonas (AQs) aglicones (Fig. 3) (soranjidiol, rubiadina, 1-metil éter de soranjidiol, 1-metil peter de rubiadina, damnacantal, damnacantol, 2-hiroxi-

metil AQ, heterofilina, pustulina) y una biantraquinona (5,5'-bisoranjidiol), de los cuales las tres últimas resultaron estructuras químicas nuevas para esta familia de compuestos químicos.

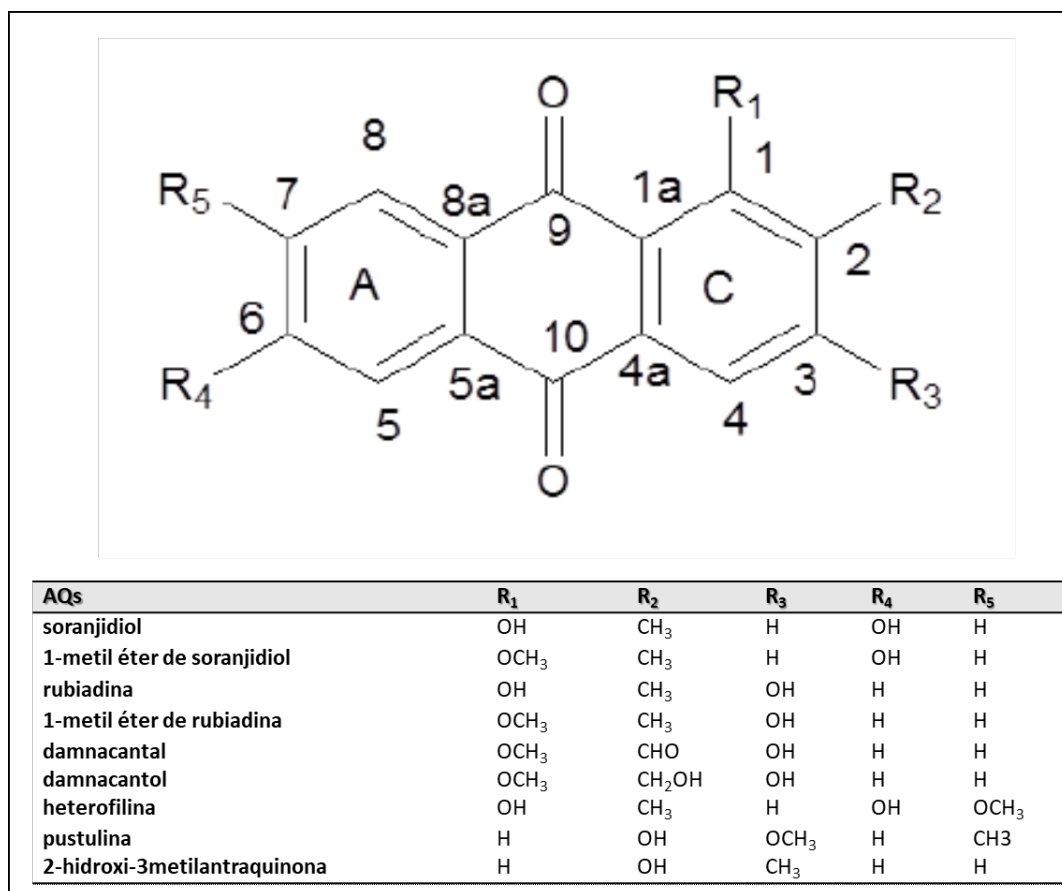


Figura. 3. Estructura química de las antraquinonas identificadas en *H. pustulata*.

Las AQs son metabolitos secundarios presentes en muchas especies vegetales, constituyendo el grupo más numeroso de quinonas encontradas en diversos géneros y especies vegetales, con una gran diversidad de efectos biológicos (Vickery y Vickery, 1981). Núñez Montoya y col. (2003, 2006), establecieron que las AQs aisladas y purificadas de esta especie vegetal poseen actividad fotosensibilizante Tipo I (producción de $O_2^{\bullet-}$) y/o Tipo II

(generación de $^1\text{O}_2$) (Núñez Montoya y col., 2005, Comini y col., 2007); y por lo tanto, estarían involucradas en el efecto fototóxico descrito para esta planta. En un trabajo posterior, Núñez Montoya y col. (2008) determinaron que el efecto tóxico de esta planta en ratones (*in vivo*) se debe a la presencia de AQs, pero no describieron las lesiones dérmicas.

Por otro lado, se ha demostrado que los extractos ricos en derivados antraquinónicos, provenientes de partes aéreas de *H. pustulata*, poseen propiedades antimicrobianas, antifúngicas (Núñez Montoya y col., 2003) y antivirales *in vitro* (Konigheim y col. 2012); por lo que las AQs, potencialmente pueden ser empleada con usos farmacológicos. Ante esto, el conocimiento de los diversos aspectos vinculados a la toxicidad de *H. pustulata* son de utilidad para evitar problemas en la salud humana.

VI-4.DERMATOPATOLOGÍA EN LA FOTOSENSIBILIZACIÓN.

En general, la lesión histopatológica a nivel cutáneo, en los cuadros de fotosensibilización, es definida como "necrosis coagulativa de la epidermis" (Ginn y col., 2007); sin embargo, los estudios respecto a esto son escasos. Con más detalle, en cuadros de fotosensibilización debido a porfiria congénita (Tipo III), se ha identificado acantosis focal, exudación, paraqueratosis y ocasionalmente disqueratosis (Scott y col; 1979). Se ven afectados también elepitelio folicular, las glándulas anexas y la dermis superficial (Ginnycol.,

2007). Se observan hendiduras subepidérmicas y con la tinción de PAS (Ácido peryódico de Schiff) se identificó que la membrana basal forma el suelo de éstas. En la dermis superficial se observa fibroplasia con la presencia de muchas fibras colágenas, ligeramente basófilas y delgadas (Scott y col; 1979). Un rasgo característico es que los vasos sanguíneos de la dermis superficial presentan engrosamiento de sus paredes, debido a la presencia de un material hialino que va depositándose entre los paquetes de colágeno (Scott y col; 1979). Esta lesión ha sido definida por Ginn y col. (2007) como "degeneración fibrinoide" e indican que puede estar asociada a trombosis. La respuesta inflamatoria consiste en ocasionales agrupaciones cercanas a los vasos sanguíneos de neutrófilos y linfocitos (Scott y col; 1979). Por su parte, a nivel celular se ha observado que esta fotosensibilización causa alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática, resultando en una reducción del potasio intracelular y la lisis celular (Benedetto y Taylor, 1978).

Mediante inmunohistoquímica, empleando algunos marcadores de apoptosis clásicos (P53 y BCL2), se ha demostrado que la exposición a la radiación ultravioleta-B (UV-B) modifica los patrones de apoptosis a nivel epidérmico (Eström y col., 2001; Mass y col., 2003), pero no hay antecedentes sobre lo que ocurre en los casos de fotosensibilización.

VI-5. BIBLIOGRAFIA.

- ✓ AGUIRRE DH, NEUMANN, RA. (2001). Intoxicación por "cegada" (*Heterophyllaea pustulata*) en caprinos del noroeste argentino. *Medicina Veterinaria*, 18, 487-490.
- ✓ ARAYA OS, FORD EJ. (1981). An investigation of the type of photosensitization caused by the ingestion of St John's Wort (*Hypericum perforatum*) by calves. *Journal of Comparative Pathology*, 91: 135-141.
- ✓ BACIGALUPO N. (1993). Rubiaceae. En: Cabrera A (ed.), *Flora de la Provincia de Jujuy*. Colección Científica INTA. INTA, Buenos Aires; tomo XIII, parte IX, 375-380.
- ✓ BALTAZAR LM, RAY A, SANTOS DA, CISALPINO PS, FRIEDMAN AJ, NOSANCHUK JD. (2015). Antimicrobial photodynamic therapy: An effective alternative approach to control fungal infections. *Frontiers in Microbiology*, 6, 202.
- ✓ BENEDETTO AV, TAYLOR JS. (1978). *Porphyria cutanea tarda*. *Cutis*, 21:483-488.
- ✓ BOURKE CA, WHITE JG. (2004). Reassessment of the toxicity of *Hypericum perforatum* (St John's wort) for cattle. *Australian Veterinary Journal*, 82: 707-710.
- ✓ BRUCE EA. (1917). Fagopyrismus (buckwheat poisoning) and similar affections. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 52:189-194.
- ✓ CASTEEL SW, ROWE LD, BAILEY EM. (1988). Experimentally induced photosensitization in cattle with *Cooperia pedunculata*. *Veterinary and Human Toxicology*. 30: 101-104.
- ✓ COMINI LR, NÚÑEZ-MONTOYA SC, SARMIENTO M, CABRERA JC, ARGÜELLO GA. (2007). Characterizing some photophysical, photochemical

- and photobiological properties of photosensitizing anthraquinones. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 188:185-91.
- ✓ DAI T, FUCHS BB, COLEMAN JJ, PRATES RA, ASTRAKAS C, DENIS TGS, RIBEIRO MS, MYLONAKIS E, HAMBLIN MR, TEGOS GP. (2012). Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Frontiers in Microbiology*, 3(April), 1-16.
 - ✓ DE MELO WC, AVCI P, DE OLIVERIA MN, GUPTA A, VECCHIO D, SADASIVAM M, HAMBLIN MR, TEGOS GP. (2013). Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11 (7), 669-693.
 - ✓ DOLLAHITE JW, YOUNGER RL, HOFFMAN GO. (1978). Photosensitization in cattle and sheep caused by feeding *Ammi majus* (greater Ammi; Bishop's-Weed). *American Journal of Veterinary Research*, 39: 193-197.
 - ✓ EDSTRÖM DW, PORWIT A, ROS AM. (2001). Effects on human skin of repetitive ultraviolet-A1 (UVA1) irradiation and visible light. *Photodermatology Photoimmunology Photomedicine*, 17: 66-70.
 - ✓ EGYED MN, WILLIAMS MC. (1977). Photosensitizing effects of *Cymopterus watsonii* and *Cymopterus longipes* in chickens and turkey poults. *Avian Diseases*, 21: 566-575.
 - ✓ GALITZER SJ, OEHME FW. (1978). Photosensitization: A literature review. *Veterinary Science Communications*, 2: 217—230.
 - ✓ GALLO GG. (1987). Plantas tóxicas para el ganado en el cono sur de América. 2da Ed. Ed. Hemisferio sur S.A., Bs.As. Arg.
 - ✓ GINN PE, MANSELL EKLJ, RAKICH P. Skin and appendages. En: GRANT MAXIE, M (Eds). *Pathology of domestic animals*. Ed: Elsevier, Philadelphia. (2007) p: 620-627.
 - ✓ HAMBLIN MR. (2016). Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright

- new technique to kill resistant microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 33, 67-73. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.008>.
- ✓ HANSEN EW, MARTIARENA CA. (1967) Contribución al estudio de la toxicidad de *Heterophyllaea pustulata* Hook "cegadera" en el ganado, *Revista Investigaciones Agropecuarias (INTA) serie 4*, 4: 81-113.
 - ✓ HUSSAIN SM, HERLING VR, RODRIGUES PHM, NAZ I, KHAN H. (2018). Mini review on photosensitization by plants in grazing herbivores. *Tropical Animal Health and Production*, 50: 925. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1583-x>.
 - ✓ JAMES LF, NIELSEN DB, PANTER KE. (1992). Impact of Poisonous Plants on the Livestock Industry. *Journal of Range Management*, 45: 3-8.
 - ✓ KONIGHEIM B, BERANEK M, COMINI L, AGUILAR J, MARIONI J, CABRERA JL, CONTIGIANI M, NÚÑEZ MONTOYA SC. (2012). In vitro antiviral activity of *Heterophyllaea pustulata* extracts. *Natural. Product Communications*, 7: 1025-1028.
 - ✓ LEVINE IN. *Fisicoquímica*. 5º edición. McGraw-Hill. Madrid, España. (1996).
 - ✓ LOPEZ TA, ODRIOZOLA ER. (1987). Grado de riesgo de la fotosensibilización en bovinos en pastoreo de rastrojo de trigo con falsa biznaga (*Ammi majus* L). *Revista Medicina Veterinaria*, Buenos Aires, 68: 98-101.
 - ✓ MASS P, HOFFMANN K, GAMBICHLER T, ALTMAYER P, MANNHERZ HG. (2003). Premature keratinocyte death and expression of marker proteins of apoptosis in human skin after UVB exposure. *Archive Dermatology Research*, 295: 71-79.
 - ✓ NAGY EM, VIA LD, RONCONI L, FREGONA D. (2010). Recent Advances in PUVA Photochemotherapy and PDT for the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design*. 1863-1876.

- ✓ NIELSEN DB Y JAMES LF. (1992). Economic impact of poisonous plants on livestock production. L. F. James, R. F. Keeler, P. R. Cheeke, and E. M. Bailey, Jr. (Ed.) Proc. 3rd Int. Symp. on Poisonous Plants. 3. Iowa State University Press, Ames.
- ✓ NÚÑEZ-MONTOYA SC, AGNESE A., PÉREZ C, TIRABOSCHI, CABRERA JL. (2003). Pharmacological and toxicological activity of *Heterophyllaea pustulata* anthraquinone extracts. *Phytomedicine*, 10: 569-74.
- ✓ NÚÑEZ-MONTOYA SC, AGNESE A, CABRERA JL. (2006). Anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata*. *Journal of Natural Products*, 69:801-3.
- ✓ NÚÑEZ-MONTOYA SC, COMINI LR, RUMIE-VITTAR B, FERNANDEZ IM, RIVAROLA VA, CABRERA JL. (2008). Phototoxic effects of *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *Toxicon*, 51: 1409-1415.
- ✓ NÚÑEZ-MONTOYA SC, COMINI LR, SARMIENTO M, BECERRA C, ALBESA I, ARGÜELLO GA, CABRERA JL. (2005). Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: singlet oxygen and superoxide anion production. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 78:77-83.
- ✓ ODRIOZOLA E. (1984). Fotosensibilización y queratoconjuntivitis en rumiantes por el consumo de semilla de falsa biznaga. *Veterinaria Argentina*, 1:684-688.
- ✓ OERTLI EH, BEIER RC, IVIE GW, ROWE LD. (1984). Linear furocoumarins and other constituents from *Thamnosma texana*. *Phytochemistry*, 23, 439-441.
- ✓ OERTLI EH, ROWE LD, LOVERING SL, IVIE GW, BAILEY EM. (1983). Phototoxic effect of *Thamnosma texana* (Dutchman's breeches) in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 44: 1126.

- ✓ ONISZCZUK A, WOJTUNIK-KULESZA KA, ONISZCZUK T, KASPRZAK K. (2016). The potential of photodynamic therapy (PDT) - Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.83, 912-929.
- ✓ PANTER KE, JAMES LF, GARDNER DR, RALPHS MH, PFISTER JA, STEGELMEIER BL, STEPHEN T, LEE ST. (2002). Reproductive losses to poisonous plants: Influence of management strategies. *Journal Range Management*, 55:301-308.
- ✓ PIMENTEL LA, RIET-CORREA F, GUEDES KMR, MACÊDO JTSA, MEDEIROS RMT, DANTAS AFM. (2007). Fotossensibilização primária em eqüídeos e ruminantes no semi-árido causada por *Froelichia humboldtiana* (Amaranthaceae). *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 27:23-28.
- ✓ RIET-CORREA F, MADEIROS RS. (2001). Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 21(1) 38-42.
- ✓ RIET-CORREA F, MEDEIROS RMT, TOKARNIA CH, DÖBEREINER J. (2007). Toxic plants for livestock in Brazil: Economic impact, toxic species, control measures and public health implications, p.2-14. In: Panter K.E., Wierenga T.L. y Pfister J.A. (Eds), *Poisonous Plants: Global research and solutions*. CAB International, Wallingford.
- ✓ ROWE LD, NORMAN JO. (1989). Detection of phototoxic activity in plant specimens associated with primary photosensitization in livestock using a simple microbiological test. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1: 219-270.
- ✓ SCHEIE E, FLÅØYEN A, MOAN J, BERG K. (2002). Phylloerythrin: Mechanisms for cellular uptake and location, photosensitisation and spectroscopic evaluation. *New Zealand Veterinary Journal*, 50: 104- 110,

- ✓ SCHEIE E; RYSTE EV, FLÅØYEN A. (2003). Measurement of phylloerythrin (phytoporphyrin) in plasma or serum and skin from sheep photosensitized after ingestion of *Nartheicum ossifragum*. New Zealand Veterinary Journal, 51: 99-103.
- ✓ SCOTT DW, MORT JD, TENNANT BC. (1979). Dermato-histopathological changes in bovine congenital porphyria. The Cornell Veterinarian. 69: 145-158
- ✓ SHARMAN WM, ALLEN CM, VAN LIER JE. (2000). En: Methods Enzimology. (eds. in chief J.N. Abelson and M.I. Simon); Academic Press., U.S.A.; 319, 376-400.
- ✓ SMITH H L. (1909). Buckwheat-Poisoning: With Report of a Case in Man. Archives of Internal Medicine, 3:350.
- ✓ SOUZA PEC, OLIVEIRA SS, AGUIAR-FILHO CR, CUNHA ALB, ALBUQUERQUE RF, EVÊNCIO-NETO J, RIET-CORREA F, MENDONÇA F. (2012). Primary photosensitization in cattle caused by *Froelichia humboldtiana*. Research Veterinary Science, 93: 1337- 1340.
- ✓ SUÁREZ VH, DODERO AM, ALMUDEVAR FM, BERTONI EA, SALATIN AO, VIÑABAL AE, SALDAÑO R, MARTÍNEZ GM, MICHELOUD JF, FIORENTINO MA, BRIHUEGA B, ROMERA SA. (2017). Presencia de enfermedades y prácticas de manejo en majadas caprinas de los valles templados del noroeste argentino. Veterinaria Argentina XXXIV, 356: 1-25.
- ✓ STERMITZ RF, THOMAS RD, WILLIAMS MC. (1975). Furocoumarins of *Cymopterus watsonii*. Phytochemistry, 14: 1681.
- ✓ TOKARNIA CH, DÖBEREINER J, PEIXOTO PV. (2002). Poisonous plants affecting livestock in Brazil: Review. Toxicon, 40:1635-1660.
- ✓ TOKARNIA CH, FARIAS-BRITOS M, BARBOSA JD, VARGAS PEIXOTO

- P, DÖBEREINER J. Plantas/micotoxinas Fotossensibilizantes. En: Plantas tóxicas de Brasil para animais de Produção. 2da edición. Editora Helianthus, Rio de Janeiro. (2012). P 305-348.
- ✓ VICKERY M, VICKERY B. (1981). Secondary Plant Metabolism. University Park Press. Baltimore.

VII- HIPÓTESIS

- ✓ La epidermis de los animales intoxicados por *H. pustulata* presenta cambios en los índices de proliferación y muerte celular.
- ✓ La dinámica en el patrón de lesiones epidérmicas está relacionada a la concentración del rubiadina y soranjidiol en piel y sangre.
- ✓ La intoxicación con *H. pustulata* origina modificaciones en el grosor de cada uno de los estratos epidérmicos.
- ✓ Las poblaciones de células epidérmicas manifiestan una alteración morfológica y funcional en los animales intoxicados.
- ✓ Los cambios en proliferación y muerte celular generan modificaciones en la morfología de las capas epidérmicas.
- ✓ Las modificaciones generadas por la intoxicación con *H. pustulata* sobre la proliferación, diferenciación y muerte celular dependen del tiempo de la persistencia de la concentración de rubiadina y soranjidiol en piel.

VIII- OBJETIVOS

1. Objetivo general:

Establecer una correlación entre la toxicocinética de las principales AQs presentes en *H. pustulata* (rubiadina y soranjidiol), los patrones de lesión histopatológica y de la proliferación y muerte celular en la epidermis de las cabras intoxicadas, para contribuir a una mejor comprensión de la patogenia de la enfermedad y de los signos clínicos asociados.

2. Objetivos específicos:

- ✓ Determinar el índice de células en proliferación en la epidermis de los animales intoxicados y testigos para su posterior comparación entre sí y su correlación con la concentración de rubiadina y soranjidiol en piel y sangre.
- ✓ Determinar los aspectos toxicocinéticos de rubiadina y soranjidiol en cabras.
- ✓ Reconocer la dinámica de los patrones de muerte y proliferación celular en la epidermis de los animales intoxicados a través del análisis histoquímico.
- ✓ Establecer posibles modificaciones cuantitativas y cualitativas en las distintas poblaciones celulares de la epidermis y comparar las capas de la epidermis entre los animales intoxicados y los testigos.
- ✓ Caracterizar los cambios bioquímicos de la enfermedad (perfil hepático).

IX- ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE LA INTOXICACIÓN POR *H. pustulata*.

IX-1. INTRODUCCIÓN.

Estudios experimentales en animales con *H. pustulata* ("cegendera") han sido descriptos en cobayos, conejos, ovejas y bovinos (Hansen y Martiarena, 1967). Sin embargo, dichos trabajos datan de los años 60 y fueron de alcance limitado, ya que solo describen algunos aspectos clínicos de la intoxicación en esas especies. Los datos sobre intoxicación con "cegendera" en cabras son escasos y se limitan a descripciones de brotes de ocurrencia natural (Aguirre y Neuman, 2001). Por otro lado, un estudio reciente basado en encuestas a productores caprinos de los valles templados de Salta y Jujuy, indica que el 63.6% de los propietarios tienen problemas de intoxicación con esta planta (Suarez y col., 2017).

46

Núñez Montoya y col., (2008) demostraron que las principales AQ presentes en las partes aéreas de esta planta, rubiadina y soranjidiol, son responsables de la fototoxicidad, ya que la toxicidad natural pudo reproducirse en ratones mediante la administración oral de estos compuestos.

H. pustulata induce una importante pérdida económica en la producción caprina regional (Suarez y col., 2017). Por lo tanto, es necesario conocer más a fondo aspectos específicos de la toxicidad en esta especie. En este capítulo, se describen los hallazgos clínicos y patológicos en cabras intoxicadas experimentalmente con esta planta.

IX-2. MATERIALES Y MÉTODOS.

a- Selección de los Animales:

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata (Protocolo CICUAL N°= 62-3-17T). Se emplearon 10 cabras adultas puras, por cruce de raza Saanen por su capa despigmentada. Se distribuyó a los animales en 2 grupos al azar, de 5 animales cada uno (grupo tratado: GT, y grupo control: GC). Previo a iniciar el ensayo, se efectuó un perfil hematológico, renal y hepático; y se descartó a aquellos individuos que presentaran alteraciones en los perfiles mencionados, según lo establecido como valores de referencia para la especie ([Radostits y col., 2007](#)).

47

b- Colección e identificación de especies

Se colectaron hojas de *H. pustulata* en el puesto "Las Juntas", Dpto. Guachipas (Salta) (25°42'01.7"S 65°30'26.6"W). Se seleccionó este lugar por presentar antecedentes de toxicidad por esta planta. Muestras herborizadas de estos especímenes se depositaron en el herbario del Museo de Ciencias Naturales de Salta (MCNS), de la Universidad Nacional de Salta con el registro= MCNS 13006.

c- Preparación del material vegetal a administrar

A partir del material vegetal (MV) colectado, se seleccionaron las partes que suelen comer los animales: hojas y tallos finos, los cuales se secaron a temperatura ambiente y bajo sombra. Posteriormente, se molieron en un molino martillo (Mellko, Argentina) hasta lograr la consistencia de polvo. Parte de este material se destinó para identificar y cuantificar las AQs presentes en éste. En base a resultados obtenidos en experimentos previos sobre animales (Hansen y Martiarena, 1967; Nuñez-Montoya y col, 2008), la dosis tóxica de planta en polvo, se ajustó a 5 gramos por Kg de peso vivo (g/kg).

d- Identificación y cuantificación de los principios tóxicos en el material vegetal a administrar

En primer lugar, fue necesario extraer las AQs fotosensibilizantes del MV. Estudios químicos previamente realizados por Núñez-Montoya y col. (2002, 2003 y 2006), permitieron determinar que estas AQs son extraídas principalmente con benceno (Ben) y en menor medida con acetato de etilo (AcOEt). Por tanto, una porción del MV en polvo (25,83 g) se extrajo en un aparato Soxhlet con estos 2 solventes hasta agotamiento, comenzando con Ben y siguiendo con AcOEt. Cada extracto se concentró por separado en un evaporador rotatorio (Büchi, R110, Brasil) hasta sequedad, obteniendo los siguientes rendimientos: extracto Ben 6,28 %P/P y extracto AcOEt 3,76 %P/P.

Para la identificación y cuantificación de AQs se utilizó cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta-visible (HPLC-UV-Vis: High Performance Liquid Chromatography), siguiendo el procedimiento llevado a cabo por Marioni y col. (2016). Para ello, se utilizó un cromatógrafo Varian Pro Star (modelo 210, serie 04171, California, EE. UU.), equipado con un detector UV-Vis. Como fase estacionaria (FE) se utilizó una columna Microsorb-MV 100-5 C-18 (250 x 4.6 mm i.d., Agilent), a 25 °C. La fase móvil (FM) consistió en un gradiente de elusión de dos soluciones: A) ácido fórmico (HFO) 0,16 M en agua MiliQ y B) HFO 0,16 M en metanol grado HPLC (MeOH-HPLC). El gradiente de elusión comenzó con 48 % de B (2 min, 1,0 mL/min) que cambió a 78 % durante 4 min con un flujo de 0,8 mL/min, permaneciendo 2 min; mediante una segunda rampa (2 min y 0.5 mL/min) llegó a 84 % B (30 min), y en una tercera rampa (1 min y 0.7 mL/min) se alcanzó el 100 % B (4 min), regresando a las condiciones iniciales durante 1 min. El detector se ajustó a 269 nm. El volumen de inyección manual fue de 20 µL. El análisis de los datos se realizó con el software Varian (Star Chromatography Workstation 6.41, California, EE. UU.). Cada extracto seco y cada compuesto de referencia se pesaron con precisión, y luego se disolvieron en el volumen necesario de MeOH-HPLC (Sintorgan) para obtener soluciones de 1 mg/mL (muestra y estándares), las cuales se filtraron a través de papel Whatman No. 1 (sistema de microfiltración).

La identificación de cada AQ en los extractos obtenidos (Ben y AcOEt) se realizó por comparación de los tiempos de retención (t_R) con los compuestos de referencia, previamente obtenidos por el grupo de la Dra. Núñez Montoya. Además, se desarrolló co-cromatografía, agregando a cada extracto el estándar en una concentración que permitiera el aumento del área debajo del pico (AUP) correspondiente a la AQ que se trataba de identificar. Los valores de t_R de cada metabolito identificado y de los estándares se expresaron como medias \pm SD a partir de tres inyecciones para cada muestra.

El método de calibración externase utilizó para la cuantificación de las AQs en ambos extractos. La concentración de AQs totales en cada extracto se expresó como rubiadina. Para ello, se realizó una curva de calibración con rubiadina estándar (94-96% de pureza determinada por HPLC-UV-Vis), graficando el AUP en función de cada concentración de analito. A partir de una solución madre de rubiadina (1 mg/mL) en MeOH-HPLC, se prepararon cinco diluciones consecutivas (1: 2) en el rango de $0,10 - 6,25 \times 10^{-3}$ mg/mL. La solución madre se preparó por triplicado para obtener tres réplicas de cada dilución, de modo que la curva de trabajo (con cinco puntos) se construyó por triplicado. A su vez, se repitió el procedimiento para obtener la curva de calibrado en dos días consecutivos, siendo necesario mantener todas las soluciones de estándar de AQ y de trabajo a -20°C . Se realizó un análisis de

regresión lineal, en el que el valor mínimo aceptable para el coeficiente de correlación (R^2) de la curva fue de 0,99 o más. Usando la curva de calibración de rubiadina ($y = 59334x + 71$, $R^2 = 0,9953$), la concentración de cada AQ (mg/mL) en los extractos se estimó mediante la interpolación de la AUP para cada compuesto. Luego, la concentración de cada compuesto se expresó en g cada 100 g de extracto seco (% P/P); así, la suma de todas estas concentraciones nos indica la cantidad de AQs totales (g) en 100 g de extracto, y mediante cálculos simples se puede calcular los g totales de AQs en 100 g de MV.

e- Intoxicación de los animales

A los animales del GT se les administró una dosis única del MV en polvo mediante sonda orofaríngea y al GC el volumen correspondiente de heno de alfalfa. Posteriormente, todos los animales se mantuvieron bajo exposición solar durante el tiempo necesario para el desarrollo de la signología clínica. Durante este periodo, se observó el comportamiento de los animales para detectar cambios en su conducta, como desasosiego y fotofobia. Los hallazgos clínicos, fueron tabulados mediante criterios subjetivos de severidad. Se tomó como tiempo de partida ($t = 0$) la administración de la planta.

f- Evaluación del daño hepático

Para la evaluación del daño hepático se realizaron dos estudios: por un lado, el estudio de algunos parámetros hematológicos de daño hepático en los animales y, por el otro, se efectuó una biopsia hepática en el momento en que los signos clínicos se detuvieron.

Para el estudio del perfil hepático se obtuvieron muestras de sangre en las 0, 8, 12, 24, 32, 48, 72, 192 y 360 h post-administración del MV en cada animal; éstas fueron centrifugadas para la obtención de suero y los siguientes parámetros fueron evaluados: gammaglutamil transferasa (GGT), glutatión oxalato transaminasa (GOT) y fosfatasa alcalina (FA), bilirrubina total (BT), directa (BD) e indirecta (BI).

Las biopsias hepáticas se recogieron siguiendo los métodos laparoscópicos descritos por Melo y col. (2015), bajo anestesia inhalatoria de los animales. Las muestras hepáticas se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%, se incluyeron en parafina, se seccionaron a 5 µm, se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) y se examinaron con un microscopio óptico (Olimpus CX41, Japon).

g- Análisis estadístico

El análisis de varianza se empleó para establecer diferencias en la densidad de los distintos parámetros evaluados entre los grupos, experimental y control, en los distintos momentos de muestreo. El ensayo de Kruskal-Wallis se utilizó como método de determinación de la significación. Las diferencias

significativas se definieron como aquellas cuyo error estándar es < 0,05. Para estos análisis se empleó el software estadístico INFO STAT (Di Rienzo y col., 2008).

IX-3. RESULTADOS.

a- Dosis tóxica

En este estudio, las hojas y tallos finos de *H. pustulata* demostraron ser tóxicas para las cabras en una dosis única de 5 g/kg de peso vivo. La toxicidad evolucionó de forma aguda y causó fotosensibilización en todos los animales del GT. Mediante el análisis por HPLC-UV-Vis de los extractos obtenidos del MV administrado, se determinó la presencia de 9 AQs: rubiadina, soranjidiol, 1-metil éter de rubiadina, 1-metil éter de soranjidiol, 2-hidroxi-3metil antraquinona, damncacantol, heterofillina, pustulina y bisoranjidiol (Fig. 3). Todas ellas, con demostrada acción fotosensibilizante Tipo 1 y Tipo 2 (Núñez-Montoya y col., 2005; Comini y col., 2007). Además, se estableció que el extracto Ben contiene 11,35 g de AQ totales cada 100 g de extracto ($11,35 \times 10^{-3}$ % P/P), mientras que el extracto AcOEt posee 3,52 mg de AQ totales cada 100 g de extracto ($3,52 \times 10^{-3}$ % P/P), todas expresadas como rubiadina. Esto indica que la concentración de AQ totales en el MV es $8,45 \times 10^{-4}$ % P/P. Por lo tanto, la dosis oral administrada de AQs, expresada como rubiadina, fue de 42,25 µg/kg de peso vivo

b- Hallazgos clínicos

Todos los animales del GT mostraron signos clínicos entre 8 y 36 h después de la administración de la planta. Los signos clínicos observados se presentan en la Fig. 4, y en la Tabla 1 se los expresa según su severidad en los distintos momentos de observación. Inicialmente (8 h después de la administración oral de la planta), se observó fotofobia, prurito, inquietud, congestión y edema. Dichos signos fueron bien evidentes entre las 24 y 36 h post-administración. Al quinto día, los signos de fotofobia y renuencia a la luz solar habían cesado. Al final del experimento (15 días después de la administración), los animales presentaron áreas alopecicas con reepitelización total o parcial. Tres de los animales presentaron ceguera parcial o total al momento de finalizar el ensayo. El GC no presentó signos clínicos durante el período del experimento.

54



Figura. 4: Variación de diferentes signos clínicos a lo largo del tiempo durante el experimento en animales tratados. **A-** 1h antes de administrar el tóxico; **B-** 72 h post- administración; **C-** 15 días post-administración.

Tabla 1- Variación de diferentes signos clínicos a lo largo del tiempo durante el experimento en animales tratados. Se expresa la gravedad promedio de los 5 animales observados. Cada signo clínico se clasificó y tabuló utilizando la siguiente escala: 0 = ausente, 1 = leve, 2 = moderada y 3 = grave.

Signos Clínicos	0h	8h	32h	60h	4 días	5 días	8 días	15 días
Fotofobia, prurito y desasosiego	0	0,4	1,4	2,4	2,4	0	0	0
Congestión ocular y lagrimeo	0	1,4	2	2,2	1,4	0,8	0	0
Edema	0	0,2	1,6	2	2,2	2,4	0,8	0
Formación de costras y alopecia	0	0	0	0	0	0	0,6	2
Hiperqueratosis y esclerosis	0	0	0	0	0	0	0	1,8
Opacidad corneal	0	0	0	0	0,2	0,6	1,4	1,6

c-Hallazgos bioquímicos

Los hallazgos bioquímicos se presentan en las Fig. 5. Solo se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores medios de GOT, BT y BD (Fig. 5) alas 72 y 192 h en los animales del GT. Los niveles de GGT y FA no ofrecieron diferencias significativas a lo largo del experimento.

55

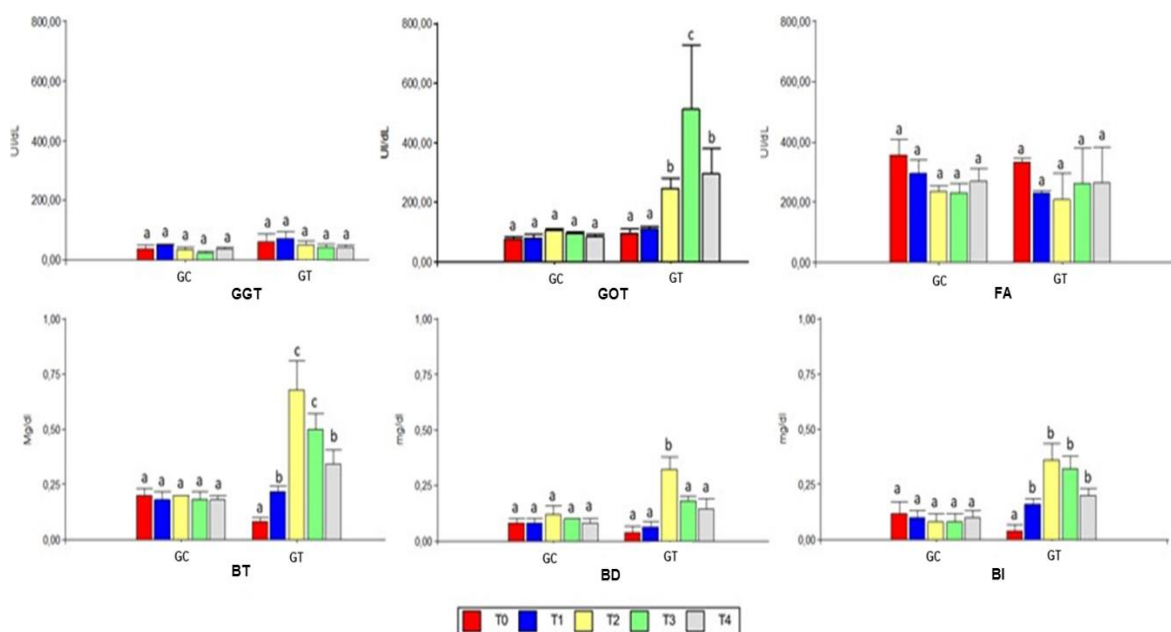


Figura. 5. Variación de las enzimas hepáticas (GGT, GOT y FA), bilirrubina total, directa e indirecta (TB, DB e IB). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos ($p < 0.05$). T0 = 1 h antes de administrar el tóxico; T1 = 24 h post administración (p-a); T2 = 72 h p-a; T3 = 120 h p-a; T4 = 192 h p-a.

d- Biopsias hepáticas

Las biopsias hepáticas se realizaron al octavo día post administración. Se observaron cambios degenerativos moderados en las muestras recogidas del GT. Las diferencias en los cortes histopatológicos entre el GC y el GT pueden observarse en la Fig. 6. En los animales que recibieron la planta tóxica (Fig. 6B), los hepatocitos estaban difusos y moderadamente tumefactos, poseían un citoplasma finamente granular, con bordes irregulares. Algunas células contenían grandes vacuolas intracitoplasmáticas que contenían glóbulos de pigmento biliar verde amarillento intracitoplásmico. Las muestras hepáticas del GC no presentaron cambios histológicos (Fig. 6.A).

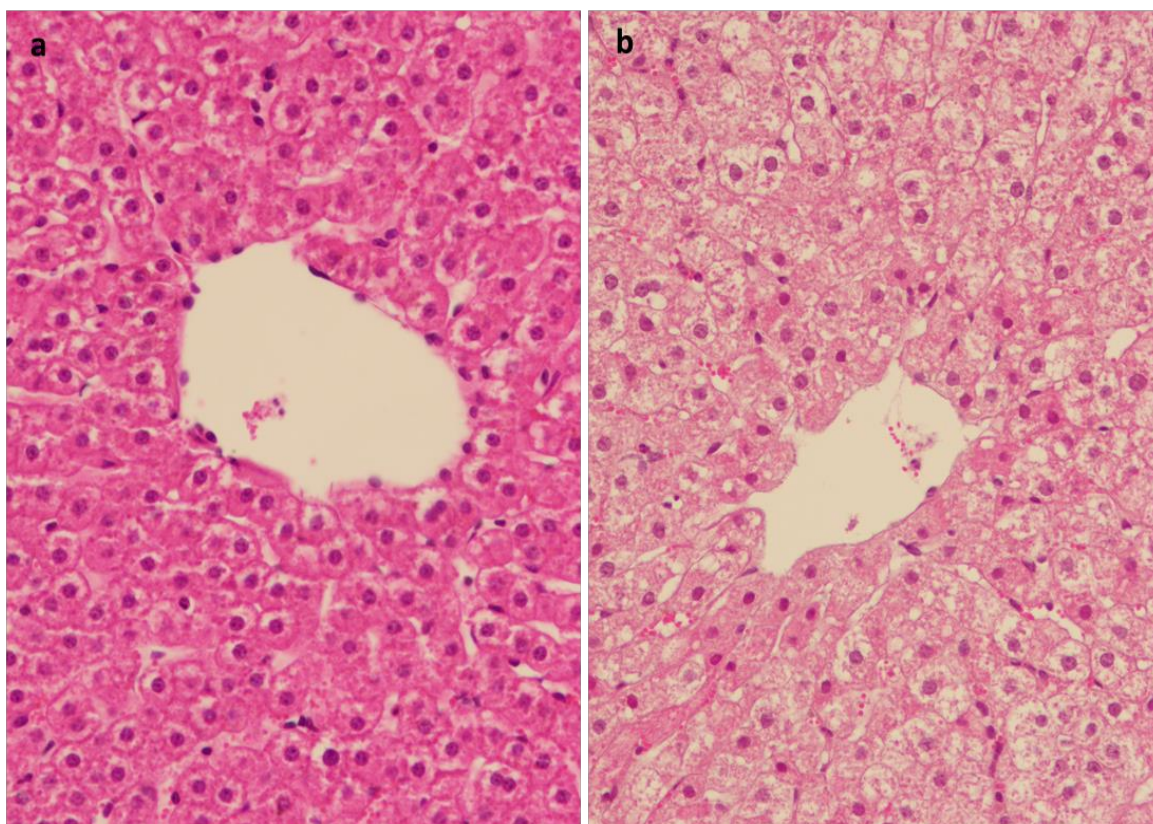


Figura. 6. Hallazgos histológicos. **A-** Imágenes histológicas de hígado en control animal. **B-** Imágenes histológicas del hígado en el animal tratado. (H&E, 40 X).

IX-4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En animales, las formas más frecuentes de fotosensibilización son tipo 1 y tipo 3. En el primer caso, los pigmentos fotosensibles ingresan preformados. En el segundo, el daño hepático induce la acumulación de filoteritina, un pigmento derivado del metabolismo de la clorofila con acción fotosensibilizante (Radostits y col., 2007).

Las hojas y tallos finos de *H. pustulata* demostraron ser tóxicas para las cabras en una dosis única de 5 g/kg de peso vivo. La toxicidad evolucionó de forma aguda y causó fotosensibilización en todos los animales del GT. La dosis oral administrada de AQ contenía alrededor de 9 derivados diferentes y fue de 42,25 µg/kg, expresada como rubiadina.

57

Como se observó, los primeros signos clínicos de toxicidad de *H. pustulata* aparecen a las pocas horas de su administración (8 h) y progresa rápidamente. Los signos clínicos tempranos (fotofobia, prurito, inquietud, congestión y edema) son más intensos entre las 24-36 h y cesan aproximadamente al quinto día posterior a la administración de la planta. Por otro lado, los signos clínicos que se manifestaron más tarde (formación de costras, alopecia, alopecia, entre otros) se hacen más evidentes a partir del día 8. Estos resultados no concuerdan con lo mencionado en la bibliografía para los casos de fotosensibilización secundaria. Esta forma de

fotosensibilización ocurre secundariamente al daño hepático, asociado a colestasis intrahepática (Kelly 1993). Es así, que las plantas que producen fotosensibilización secundaria requieren períodos de consumo más largos para generar signos clínicos de fotosensibilización. En general, cabras y ovejas intoxicadas experimentalmente con algunas de estas especies vegetales, expresan los signos clínicos entre 10 y 60 días después de la administración (Aslani y col, 2003, 2004). Del mismo modo, las cabras intoxicadas experimentalmente con esporidesmina (una micotoxina que genera fotosensibilización secundaria) desarrollaron la enfermedad 21 días después de 3 días consecutivos de la administración oral de la toxina (Smith y Embling, 1991).

Además, la mortalidad en los casos de fotosensibilización hepatógena suele ser alta en ovejas y cabras; y además la ictericia es un hallazgo constante en estas especies (Kellerman y col., 1988, Rowe, 1989, Kelly, 1993, Tokarnia y col., 2012). Esto no sucedió en nuestro experimento; ninguno de los animales reveló ictericia o murió durante el ensayo. Por el contrario, entre los 8 y 15 días los animales comenzaron a mostrar una mejora general reanudando el consumo de alimento. En conclusión, todos los hallazgos clínicos observados indican que *H. pustulata* induce una fotosensibilización de tipo primaria.

Respecto a las lesiones de fotosensibilización, el mayor daño a nivel cutáneo se manifestó en la piel de la cabeza, principalmente en las orejas, región palpebral y nariz. Rowe (1989) indicó que, en cabras y ovejas, estas lesiones se concentran en esas áreas debido a la falta de pelo y lana. Dicho autor menciona que en los animales esquilados, las lesiones pueden expandirse al cuello y a la espalda. En este ensayo, a pesar de que las cabras fueron completamente despigmentadas, no hubo expansión de las lesiones a otras áreas del cuerpo.

Las lesiones histopatológicas identificadas en el hígado del animal tratado con *H. pustulata* son lesiones degenerativas menores y justifican las elevaciones observadas en GOT, BD y BT. Este daño pudo deberse al efecto directo de las AQ sobre el tejido hepático o como producto de los cambios generales que ocurren en los animales intoxicados (anorexia e inflamación). Esta última hipótesis puede ser plausible, ya que en humanos, después de una lesión térmica, se presenta un grado variable de daño hepático y generalmente está relacionado con la gravedad de la lesión térmica (Jeschke 2009). Jeschke y col. (2001) han demostrado que el peso del hígado y la relación hígado/peso corporal aumentaron significativamente de 2 a 7 días después de la quemadura en ratas. En pacientes con quemaduras, se ha demostrado que hay elevaciones de GOT, GPT y bilirrubina sérica durante un

período de 4 a 6 semanas después de la quemadura ([Jeschke y col., 2007](#)). En este trabajo, el valor más alto de la enzima GOT se identificó durante la primera semana y luego disminuyó bruscamente en la segunda hasta que se normalizó. Todos estos hallazgos concuerdan con los observados en pacientes con quemaduras severas en la piel. En dichos pacientes, los cambios hepáticos se atribuyen a dos posibles mecanismos: (1) hipoperfusión del sistema esplácnico y (2) elevación de citocinas proinflamatorias ([Klein y col., 2003](#); [Jeschke y col., 2007](#)). Por el contrario, normalmente, en la fotosensibilización secundaria, se han observado altos niveles de enzimas hepáticas y bilirrubina total y directa durante un período prolongado de tiempo ([Glenn y col., 1964](#)). También Mouldin y Kennedy ([2016](#)) indicaron que la lesión de los eritrocitos en la circulación cutánea puede producir una hemólisis grave, y este hecho podría explicar los niveles séricos de TB, DB y GOT encontrados en el GT.

60

El daño hepático en la fotosensibilidad hepatogénica se puede dividir en dos clases generales; los que resultan de daños principalmente en el parénquima hepático y aquellos que afectan el sistema biliar ([Rowe 1989](#)). En el presente trabajo, el daño causado por la planta toxica afecta difusamente el parénquima hepático al igual que otras intoxicaciones fotosensibilizantes producidas por *Lantana camara* y *Microcystis aeruginosa* ([Seawright y col., 1983](#), [Jackson y col., 1984](#); [Ide y Tutt, 1998](#)). Sin embargo, en estas

intoxicaciones el daño hepático es más severo que el encontrado en animales intoxicados con *H. pustulata* (Seawright y col., 1983; Jackson y col., 1984; Ide y Tutt, 1998).

En conclusión, a pesar del ligero daño observado a nivel hepático, los hallazgos clínicos sugieren que este es un caso de fotosensibilidad primaria tal como lo señalo Núñez-Montoya y col. (2008) en ratones experimentalmente intoxicados con una fracción que contenía rubiadina y soranjidiol.

IX-4. BIBLIOGRAFIA

- ✓ AGUIRRE DH AND NEUMANN RA. (2001). Intoxicación por "cegada" (*Heterophyllaea pustulata*) en caprinos del noroeste argentino. *Medicina Veterinaria* 18: 487-490.
- ✓ ASLANI MR, MOVASSAGHI AR, MOHRI M, EBRAHIM-POUR V, MOHEBI AN. (2004). Experimental *Tribulus terrestris* poisoning in goats. *Small Ruminant Research* 51: 261-267.
- ✓ ASLANI MR, MOVASSAGHI AR, MOHRI M, PEDRAM M, ABAVISANI A. (2003) Experimental *Tribulus terrestris* poisoning in sheep: clinical, laboratory and pathological findings. *Veterinary Research Communications* 27: 53-62.
- ✓ COMINI LR, NÚÑEZ-MONTOYA SC, SARMIENTO M, CABRERA JC, ARGÜELLO GA. (2007). Characterizing some photophysical, photochemical and photobiological properties of photosensitizing anthraquinones. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 188:185-91.
- ✓ DI RIENZO JA, CASANOVES F, BALZARINI MG, GONZALEZ L, TABLADA M, ROBLEDO CW. (2008). InfoStat versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- ✓ GLENN BL, MONLUX AW, PANCIERA RJ. (1964). A hepatogenous photosensitivity disease of cattle. I. Experimental production and clinical aspects of the disease. *Veterinary Pathology* 1: 469-484.
- ✓ HANSEN EW AND MARTIARENA CA. (1967). Contribución al estudio de la toxicidad de *Heterophyllaea pustulata* Hook "cegada" en el ganado. *Revista Investigación Agropecuaria (INTA)* 4: 81- 113.

- ✓ IDE A AND TUTT CLC. (1998). Acute *Lantana camara* poisoning in a Boer goat kid: case report. Journal of the South African Veterinary Association 69: 30-32.
- ✓ JACKSON ARB, MCINNES A, FALCONER IR, RUNNEGAR MTC. (1984). Clinical and pathological changes in sheep experimentally poisoned by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Veterinary Pathology 21: 102-113.
- ✓ JESCHKE MG. (2009) The hepatic response to thermal injury: is the liver important for post burn outcomes?. Molecular Medicine 15: 337.
- ✓ JESCHKE MG, LOW JA, SPIES M, VITA R, HAWKINS HK, HERNDON DN, BARROW RE. (2001). Cell proliferation, apoptosis, NF- κ B expression, enzyme, protein, and weight changes in livers of burned rats. American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology 280: 1314-1320.
- ✓ JESCHKE MG, MICAK RP, FINNERTY CC, HERNDON DN, (2007). Changes in liver function and size after a severe thermal injury. Shock 28: 172-177.
- ✓ KELLERMAN TS, COETZER JAW, NAUDÉ TW. (1988). Plant poisonings and mycotoxicoses of livestock in southern Africa. Oxford University Press, Cape Town.
- ✓ KELLY WR. (1993). The liver and biliary system. In Jubb K.V.F, Kennedy P.C., Palmer N. (eds). Pathology of domestic animals, vol. 2 (4th edn). Academic Press, San Diego.
- ✓ KLEIN D, EINSPANIER R, BOLDER U, JESCHKE MG. (2003). Differences in the hepatic signal transcription pathway and cytokine expression between thermal injury and sepsis. Shock 20: 536-543.

- ✓ MARIONI J, ARCE JE, CABRERA JL, PARAJE MG, NÚÑEZ MONTOYA SC. (2016). Reduction of *Candida tropicalis* biofilm by photoactivation of a *Heterophyllaea pustulata* extract. *Pharmaceutical Biology* 3: 1-11.
- ✓ MELO CH, SOUSA FC, BATISTA RIPT, SANCHEZ DJD, SOUZA-FABJAN JMG, FREITAS VJF, TEIXEIRA DIA. (2015). Comparative analysis of laparoscopic and ultrasound- guided biopsy methods for gene expression analysis in transgenic goats. *Genetics and Molecular Research* 14: 8672-8684.
- ✓ MOULDIN EA AND PETERS-KENNEDY J. (2016). Integumentary System. In: Grant Maxie M. Jubb, Kennedy and Palmers' s Pathology of domestic animals. Ed. Elsevier. Sixth edition, Vol 1. Chapter 6. pp: 509-736
- ✓ NÚÑEZ-MONTOYA SC. (2002). Metabolitos secundarios en *Heterophyllaea pustulata* Hook.f. (Rubiáceas). [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- ✓ NÚÑEZ-MONTOYA SC, AGNESE A, PÉREZ C, TIRABOSCHI I, CABRERA JL. (2003). Pharmacological and toxicological activity of *Heterophyllaea pustulata* anthraquinone extracts. *Phytomedicine* 10: 569-574.
- ✓ NÚÑEZ MONTOYA SC, COMINI LR, SARMIENTO M, BECERRA C, ALBESA I, ARGÜELLO G, CABRERA JL. (2005). Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: singlet oxygen and superoxide anion production. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.*) 78: 77-83.
- ✓ NÚÑEZ-MONTOYA SC, AGNESE A, CABRERA JL. (2006). Anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata*. *Journal of Natural Products*, 69:801-3.

- ✓ NUÑEZ-MONTOYA SC, COMINI LR, RUMIE-VITTAR B, FERNANDEZ IM, RIVAROLA VA, CABRERA JL. (2008). Phototoxic effects of *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *Toxicon* 51: 1409-1415.
- ✓ RADOSTITS OM, GAY CC, HINCHCLIFF KW, CONSTABLE PE. (2007). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th ed. W.B.264 Saunders, London, UK.
- ✓ ROWE LD. (1989). Photosensitization Problems in Livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 5: 301- 323.
- ✓ SEAWRIGHT AA, EVERIST SL, HRDLICKA J. (1983). Comparative features of *Lantana*, *Myoporum*, and *Pimelea* toxicities in livestock. In Keeler RF, Tu AT (eds): *Handbook of Natural Toxins*, vol 1. Plant and Fungal Toxins. New York, Marcel Dekker, pp 511-539.
- ✓ SUÁREZ VH, DODERO AM, ALMUDEVAR FM, BERTONI EA, SALATIN AO, VIÑABAL AE, SALDAÑO R, MARTÍNEZ GM, MICHELOUD JF, FIORENTINO MA, BRIHUEGA B, ROMERA SA. (2017). Presencia de enfermedades y prácticas de manejo en majadas caprinas de los valles templados del noroeste argentino. *Veterinaria Argentina XXXIV*, 356: 1-25.
- ✓ SMITH BL AND EMBLING PP. (1991). Facial eczema in goats: the toxicity of sporidesmin in goats and its pathology. *The New Zealand Veterinary Journal* 39: 18-22.
- ✓ TOKARNIA CH, FARIAS-BRITOS M, BARBOSA JD, VARGAS PEIXOTO P, DÖBEREINER J. (2012). Plantas/micotoxinas Fotossensibilizantes. In: *Plantas tóxicas de Brasil para animais de Produção*. 2th edición. Editora Helianthus, Rio de Janeiro.BR. pp 305-348.

X- ASPECTOS DERMATOPATOLÓGICOS DE LA INTOXICACIÓN POR *H. pustulata*.

X-1. INTRODUCCIÓN.

La dermatitis por fotosensibilización es un trastorno cutáneo frecuente en animales y humanos que ocurre cuando se depositan pigmentos fotodinámicos en la piel expuesta a la luz solar (Mouldin y Kennedy, 2016). Los efectos de la radiación solar en la epidermis se conocen desde hace años, y numerosos estudios se centran en el daño directo del sol o la radiación ultravioleta (UV) en el tejido cutáneo (Polefka y col., 2012). Sin embargo, en el caso de la fotosensibilización la mayoría de los estudios dermatopatológicos se refieren a casos naturales (Scott y col., 1979), mientras que no existen estudios experimentales ni informes sobre la evolución de las lesiones cutáneas inducidas por sustancias fotosensibilizantes.

67

Las sustancias fotosensibilizantes absorben luz UV o visible, excitan sus electrones o los transfieren a moléculas del medio. Cuando los electrones excitados regresan a un estado menos excitado, hay liberación de energía que puede conducir a la generación de $^1\text{O}_2$ altamente reactivo (Mecanismo fotosensibilizante Tipo 2). Cuando hay transferencia de electrones, especialmente con el $^3\text{O}_2$ del medio, se producen radicales libres, específicamente $\text{O}_2^{\bullet-}$ que genera posteriormente peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y HO^{\bullet} (Mecanismos Tipo 1). Estas ERO a su vez pueden reaccionar y dañar las

membranas lipídicas, las proteínas y los ácidos nucleicos, causando daño celular y la muerte (Wojcinsky y col., 2013)

Las AQs son un grupo de sustancias fotoactivas presentes en algunas plantas (Núñez-Montoya y col, 2005). Varias de ellas han sido identificadas en *H. pustulata* (Núñez-Montoya y col., 2005, 2008) que ha demostrado tener actividad fotosensibilizante en casos naturales y experimentales (Núñez-Montoya y col., 2008; Micheloud y col., 2017). El objetivo de este capítulo fue estudiar las lesiones histopatológicas secuenciales, incluida la proliferación y los patrones de muerte celular, observados en una intoxicación experimental con *H. pustulata* en cabras.

X-2. MATERIALES Y MÉTODOS

68

a- Estudio de las lesiones histopatológicas.

Al iniciar el experimento se colectó una biopsia cutánea de piel del dorso de la oreja mediante punch dérmico, previo bloqueo del nervio auricular mediante la administración local de lidocaína al 2 %. Este muestreo se repitió los días 0-1-3-7-15, contando desde la administración de la dosis del tóxico que produce desasosiego y fotofobia en el animal al ser expuesto a la radiación solar. Las biopsias cutáneas se fijaron en formol bufferado al 10% y se procesaron según la técnica histológica clásica para bloques parafinados, con secciones de 5 μ m y teñidas con H&E (Bancroft y Stevens, 1990). Tres de los

animales de GC se sometieron al mismo procedimiento experimental arriba descrito. La tipificación y clasificación de las lesiones histológicas se efectuó por métodos semicuantitativos empleando una escala de 0 a 3, según criterios de severidad presentados en la Tabla 2. Las muestras se evaluaron por 2 personas y los resultados se expresaron como un promedio de las dos observaciones.

Tabla 2: Criterios de clasificación empleados de las lesiones histopatológicas en las biopsias de piel.

EPIDERMIS	A- Espongiosis y cambios degenerativos 0: Ausente 1: Se observan focos aislados 2: Los focos son muchos y tienden a unirse 3: Grandes áreas afectadas abundantes figuras acantolíticas.
	B- Necrosis epidérmica 0: Ausente 1: Se observan focos aislados de necrosis cutánea superficial sin formación de costras 2: Áreas de necrosis más extensa que profundizan pero no rompen la membrana basal. Se observa la formación de costras 3: Áreas de necrosis profunda y extensa (+ 40% de la superficie observada). Lesiones ulcerosas
	C- Hiperplasia 0: Ausente 1: Aumento del grosor de la epidermis ligera o moderado sin formación de papilas. 2: Incremento del espesor de la epidermis con profundización de las papilas dérmicas. 3: Cuando se observa la formación de "rete pegs"
	D-Infiltración 0: Ausente 1: Focal 2: Distribución multifocal Coalescente, con formación de pústulas intra-epidérmicas 3: Difuso, con formación de pústulas intra-epidérmicas
DERMIS	A- Edema 0: Ausente 1: Pequeñas áreas especialmente perivasculares 2: Zonas más extensas con desorden tisular moderado 3: Áreas extensas y generalizadas con desorden tisular severo.
	B- Inflamación 0: Ausente 1: Pocas células en la región perivascular 2: Mayor cantidad de células infiltrando la región perivascular y la interfaz dermoepidérmica. 3: Abundante presencia de células infiltrando todos los tejidos presentes.
	C- Hemorragia 0: Ausente 1: Restringido a algunos eritrocitos peri-vasculares y peri- anexales 2: Zonas más grandes de la misma ubicación que en 1. 3: Grandes áreas de hemorragia que no están restringidas a las áreas mencionadas
	D- Neo-vascularización y proliferación conjuntiva 0: Ausente 1: Formación de pequeños vasos aislados. 2: Áreas focales de proliferación vascular 3: Grandes áreas de proliferación vascular y conjuntiva.

b- Determinación de células en proliferación y apoptosis.

Se realizó inmunohistoquímica con anticuerpos anti PCNA (Antígeno nuclear de proliferación celular) para realizar el recuento del número de células ciclantes, y anticuerpos anti BAX2 (BCL2 Associated X protein) y BCL2 (Célula-B CLL/linfoma 2) para estimar el balance entre ambas proteínas y así evaluar la apoptosis en la epidermis. En la dermis solo se evaluó la expresión de PCNA.

c- Técnicas inmunohistoquímicas

La expresión de proteínas relacionadas con el ciclo celular y apoptosis se evaluó por inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos específicos (anti-PCNA, Bax2 y Bcl2). Los tiempos de incubación, marcas comerciales y otros datos se exponen en la tabla 3. Los cortes desparafinados se hidrataron y se realizó recuperación antigénica mediante su inmersión en una solución tamponada de citrato (pH 6), en un horno de microondas a temperaturas superiores a 100 °C durante 5 min; con esto se consigue el "desenmascaramiento" de las ligaduras existentes entre las cadenas proteicas del tejido, originadas por la acción del formaldehído como fijador. Posteriormente, se bloquearon las uniones inespecíficas mediante la incubación con albúmina sérica bovina (BSA) al 1%. La incubación con los anticuerpos primarios antes señalados, se realizó durante 24 ha 4 °C. El sistema de detección y amplificación de la inmunohistoquímica fue el EnVision® Dako Cytomation, Carpintería, CA, EEUU. El mismo consta de un

polímero de dextrano marcado con la enzima peroxidasa y conjugado con inmunoglobulina; y por lo tanto, con capacidad de unirse al anticuerpo primario. La enzima peroxidasa asociada al polímero actúa sobre el agua oxigenada que se agrega junto con el sistema revelador, el cual está constituido por el cromógeno 3',3'-diaminobencidina. La coloración de contraste se realizó con hematoxilina (Gimeno y col., 2005).

Tabla 3. Procedencia y condiciones de uso de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Anticuerpos primarios	Origen	Dilución	Incubación	Procedencia
Bcl-2 (ab7973); policlonal	Conejo	1:100	18 h 4°C	Abcam
Bax (PU347-UP); policlonal	Conejo	1:30	18 h 4°C	BioGenex
PCNA (clon PC-10); monoclonal	Ratón	1:100	18 h 4°C	Novocastra

d- Análisis de imágenes

Cinco imágenes correspondientes a los distintos cortes a estudiar se capturaron con una cámara de video digital (EvolutionVF, QImaging, USA), montada sobre un microscopio trinocular (Olympus BX50, Tokyo, Japan) y conectada con una computadora de alto rendimiento (Pentium IV, 2.6 GHz). Todas las imágenes se procesaron y analizaron mediante el programa ImagePro Plus v5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA). Las imágenes se guardaron en formato TIFF de 24 bits, RGB, para conservar todos los detalles observados al microscopio (Portiansky a y b, 2005). Todos los datos numéricos obtenidos a partir del análisis realizado sobre las imágenes se exportaron a una

planilla de cálculo para su posterior análisis estadístico. La cuantificación para los distintos anticuerpos empleados se expresó como % de área inmunomarcada para poder comparar entre sí.

e- Análisis estadístico

El análisis de varianza será utilizado para establecer diferencias en la densidad en los distintos parámetros evaluados entre los grupos experimentales y control en los distintos momentos de muestreo. El test de Kruskal Wallis se utilizó como método de determinación de la significación. Las diferencias significativas se definieron como aquellas cuyo error estándar sea < 0,05. Para estos análisis se empleó el software estadístico INFO STAT (Di Rienzo y col., 2008).

X-3. RESULTADOS

a. Lesiones histopatológicas.

Las lesiones cutáneas histopatológicas consistieron esencialmente en una extensa dermatitis necrotizante de interface. Los cambios histológicos ocurridos durante el experimento se muestran en la Tabla 3 y la Fig. 7. Inicialmente, a las 32-72 h, la epidermis mostró una serie de cambios degenerativos que afectaban principalmente al estrato espinoso de la epidermis e incluían espongiosis, acantolisis difusa y formación de vesículas intraepidérmicas. La apoptosis de las células en la capa epidérmica fue más alta

en este período y estas células apoptóticas son compatibles con las llamadas células de quemadura solar. La hiperplasia de la epidermis fue mínima en esta etapa. Las lesiones dérmicas agudas alcanzaron su punto máximo entre las 32 y 72 h e incluyeron edema caracterizado por la presencia de material eosinófilo proteináceo extracelular y también una profusa desorganización de las fibras de colágeno, hemorragias asociadas e infiltración inflamatoria principalmente por neutrófilos. Las células inflamatorias se localizaron primero en la unión dermoepidérmica, extendiéndose hacia la capa epidérmica (exocitosis) y formando pequeños agregados y microabscesos. Exudado perivascular y / o perianexal proteináceo también se observó en esta etapa. Entre los 72 y 8 días, el cambio más frecuente fue la necrosis epidérmica con formación de costra. El tejido necrótico se extendió a los anexos y se acompañó de hiperplasia epidérmica (acantosis) y proliferación conjuntiva y vascular de la dermis. Las muestras tomadas entre 8 y 15 días mostraron una acantosis intensa con abundante presencia de figuras mitóticas en la capa basal, formación de rete clavijas e hiperqueratosis. Los cambios dérmicos en esta etapa se caracterizaron por la formación de tejido de granulación con neovascularización y proliferación conjuntiva que muestra una desorganización profunda. La gran mayoría de los cambios patológicos agudos casi habían desaparecido a los 15 días.

Tabla 4- Valores medios de diferentes lesiones histopatológicas en animales tratados (n = 5) a lo largo del experimento. Las lesiones se estudiaron semicuantitativamente como 0= ausente, 1= leve, 2= moderado y 3= severo. El grosor de la biopsia representa la medida entre el cartílago y la cara dorsal del pabellón auricular.

Lesiones histopatológicas		Tiempos de muestreo				
		0h	32h	72h	8d	15d
Epidermis	Espongiosis	0	1,4	1,8	1	0,4
	Necrosis epidérmica	0	0,4	2	2,8	1,2
	Infiltración	0	0,2	1,8	0,6	0,4
	hiperplasia	0	0,2	0,5	2	3
Dermis	Edema	0	1,6	3	1	0,2
	Hemorragia	0	1,2	1,8	1,4	0,4
	Inflamación	0	2	2,4	1,6	1
	Neovascularización y proliferación conjuntiva	0	0	0,2	1,5	2,6
Grosor dermo-epidérmico		1,62±0,1	2,90±0,3	4,04±0,2	2,98±0,2	3,08±0,2

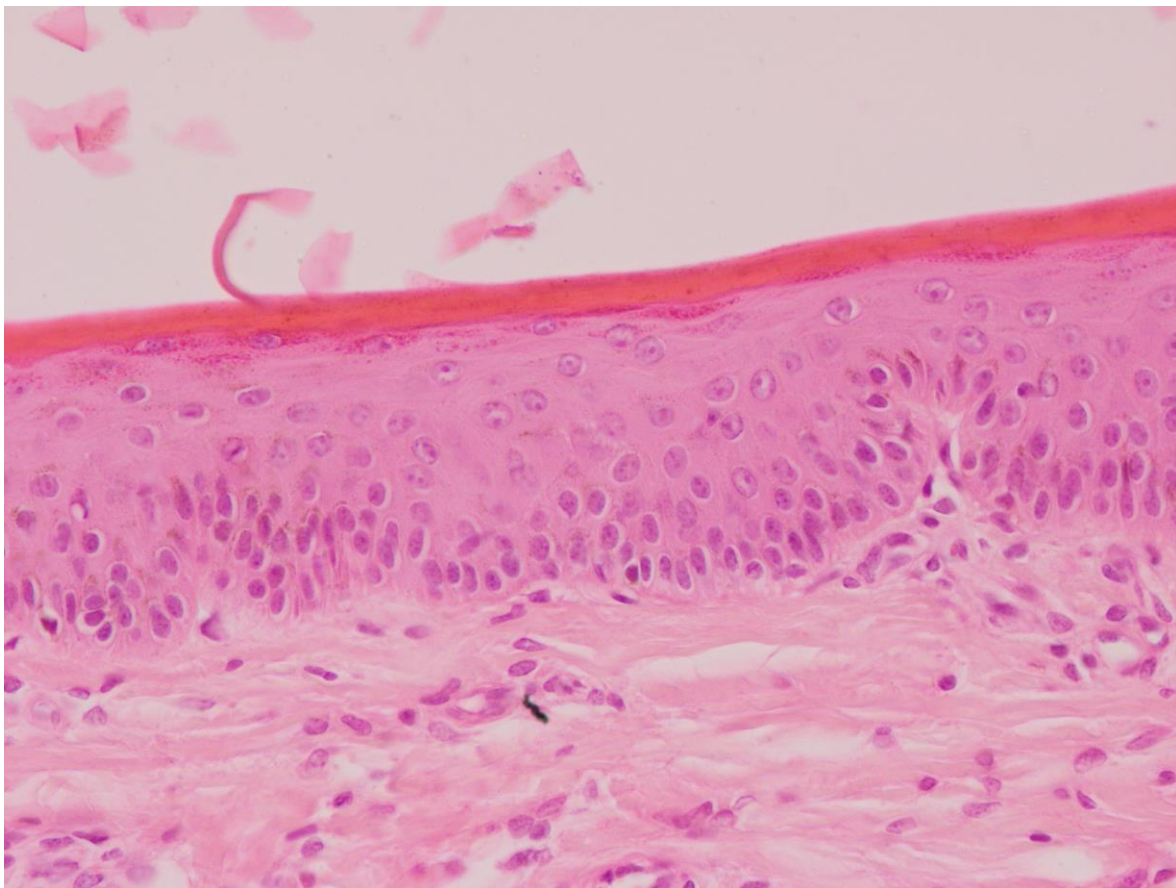


Figura. 7. Aspecto histopatológico de la piel de cabra normal (0h p-a) H&E 20X.

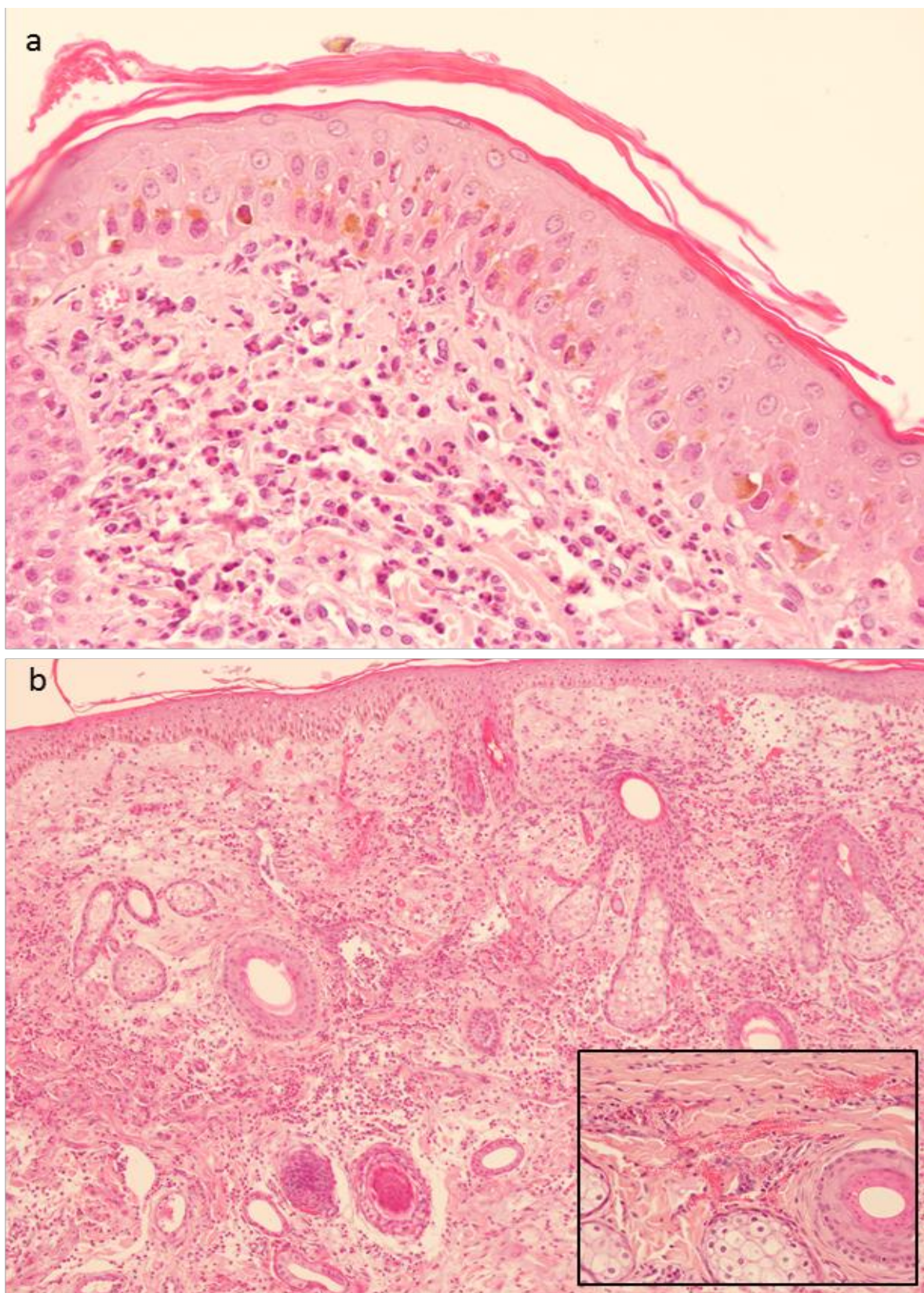


Figura. 8. Aspecto histopatológico de las biopsias de piel a las 32 h p-a. a) Detalle de los cambios epidérmicos y de la presencia de exudado neutrófilo en la unión dermo-epidérmica (H&E, 20x). b) Severa infiltración de la dermis. En el inserto se observa la hemorragia peri-anaxal. (H&E, 20x).

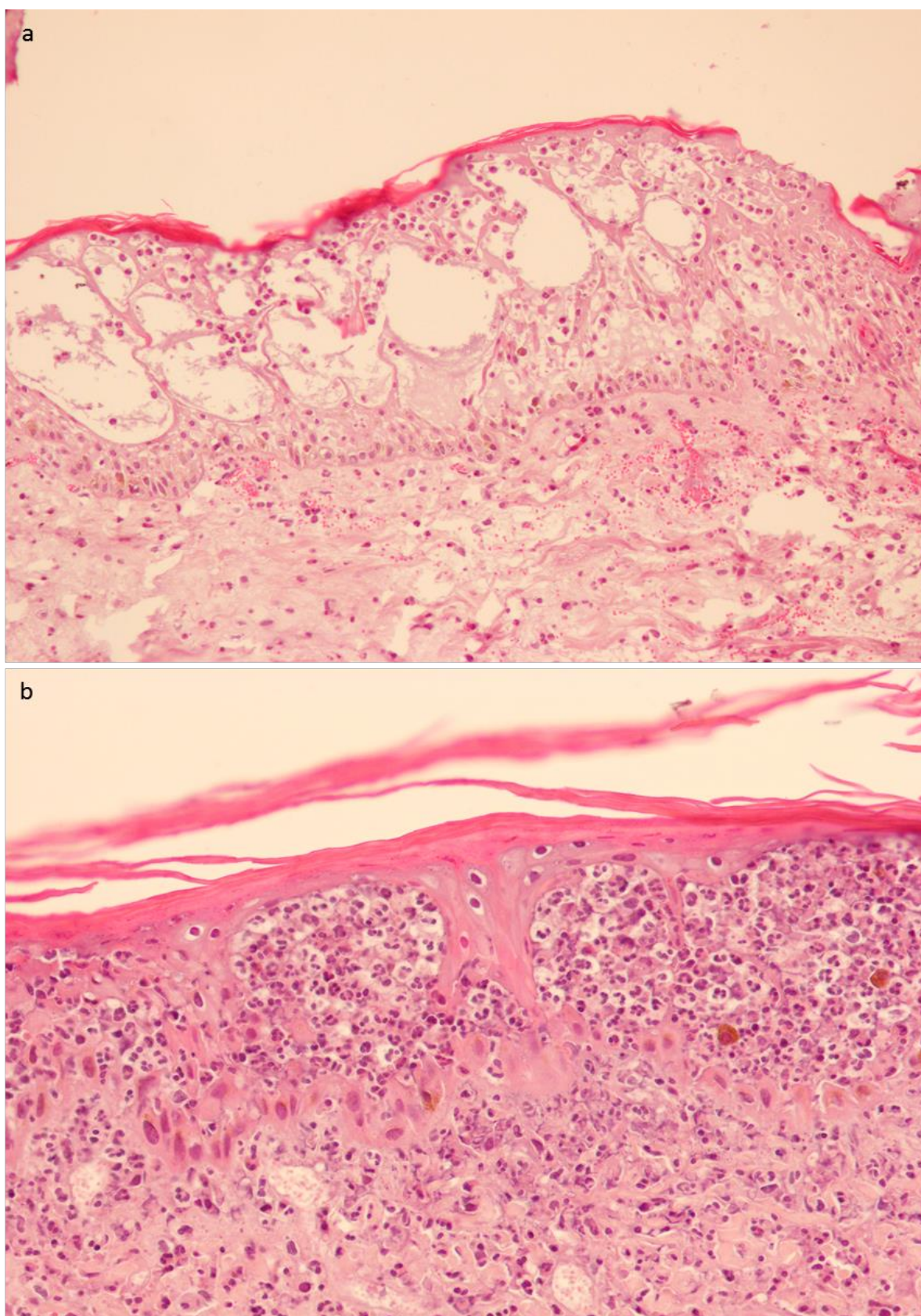


Figura. 9. Aspecto histopatológico de las biopsias de piel a las 72 h p-a. a) severa degeneración epidérmica con acántolis y formación de vesículas intra-epidérmicas. B) Formación de pústulas intra-epidérmicas y severa infiltración dermo-epidérmica. (H&E, 20x).

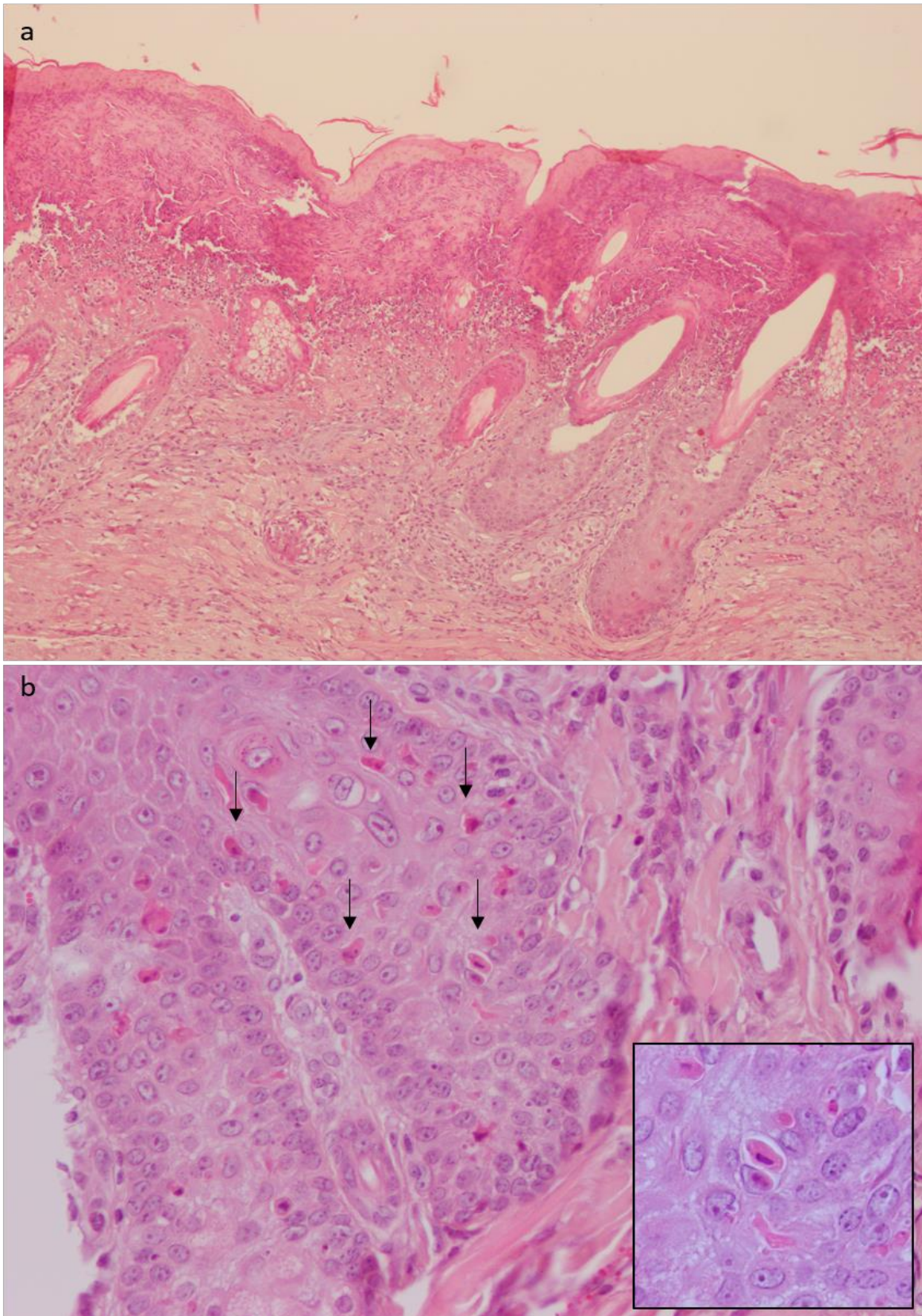


Figura. 10. Aspecto histopatológico de las biopsias de piel a las 8 días p-a. a) Necrosis coagulativa difusa severa de la epidermis (H&E, 20x). b) células de quemadura solar ("sun burn cells") en las capas basales de la epidermis. Inserto con células de quemadura solar con mayor detalle (H&E, 40x).

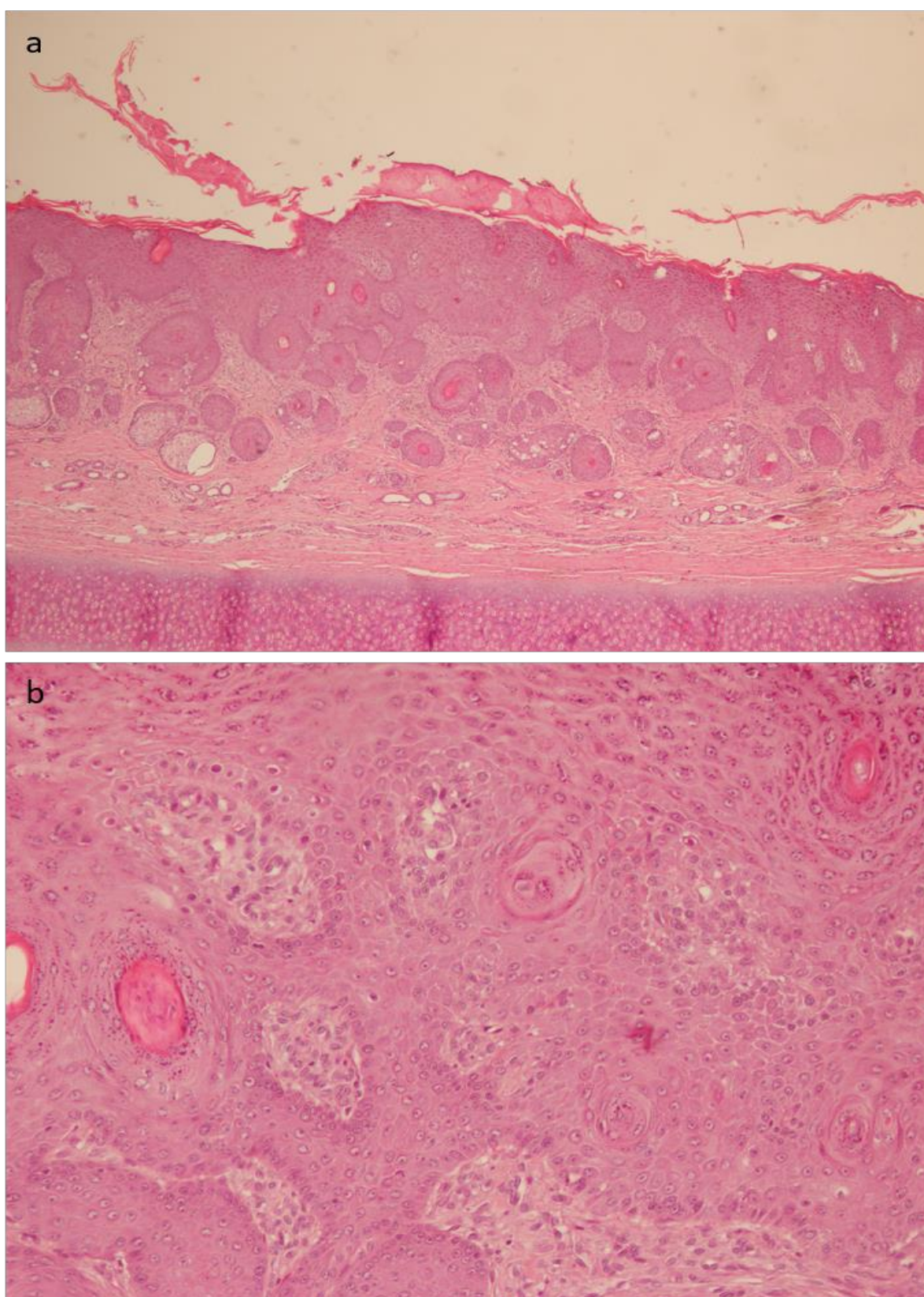


Figura. 11. Aspecto histopatológico de las biopsias de piel a los 15 días p-a. a) hiperplasia e hiperqueratosis severa con acantosis y formación de "rete pegs". b) formación de trabéculas epiteliales y nidos de células en la dermis profunda (H&E, 20x).

b. Patrones de proliferación y apoptosis en piel

La expresión de los anticuerpos anti-PCNA, BCL2 y BAX en biopsias cutáneas secuenciales se muestra en las Figs. 8-11. La expresión de los tres marcadores solo se observó a nivel epidérmico. La expresión de PCNA solo fue evaluada en dermis asociada a los fenómenos de reparación.

Bajo nuestras condiciones experimentales, la proliferación celular en la epidermis (expresión del anti-PCNA, Fig. 8), aumentó estadísticamente ($p < 0,05$) a partir de las 32 h. Los valores más altos se registraron entre 8 y 15 días ($p > 0,05$, d).

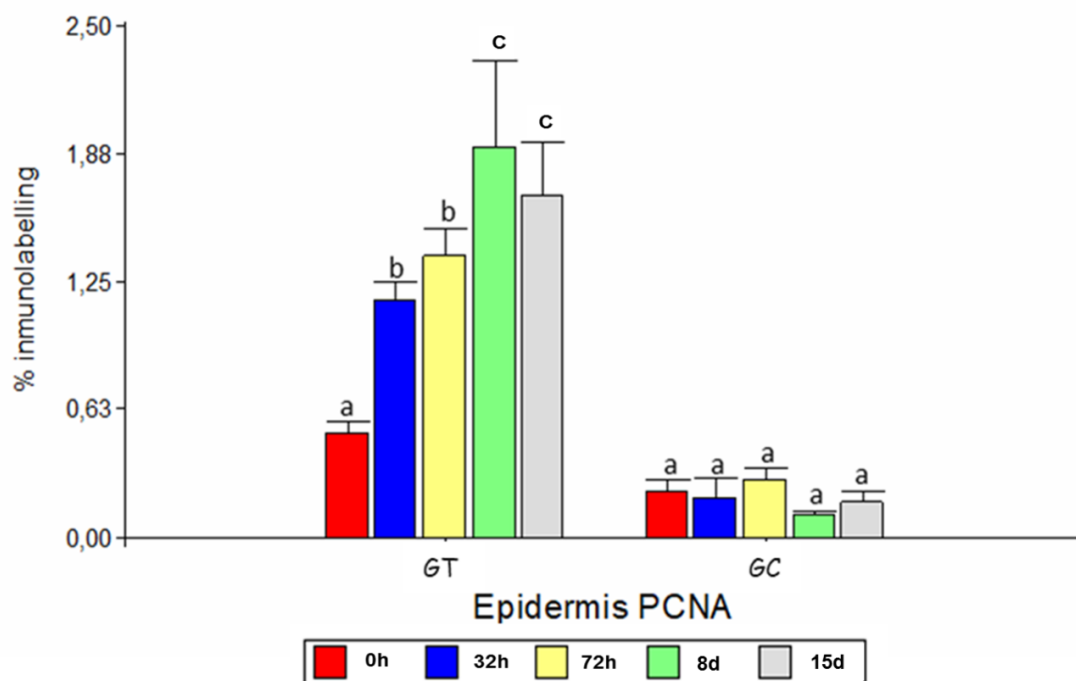


Figura. 12. Expresión del antígeno PCNA, por inmunohistoquímica en epidermis. GT: grupo tratado. GC: Grupo de control. T0= 0 h. T1) 32 h post administración (p-a). T2= 72 h p-a. T3= 8 días p-a. T4= 15 días p-a. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

La expresión de dermis-PCNA (Fig. 9) aumentó a las 32h y mostró su valor más alto a los 15 días. En la fig. 10 se observa la expresión de dicha proteína en epidermis y dermis superficial en los distintos tiempos de muestreo.

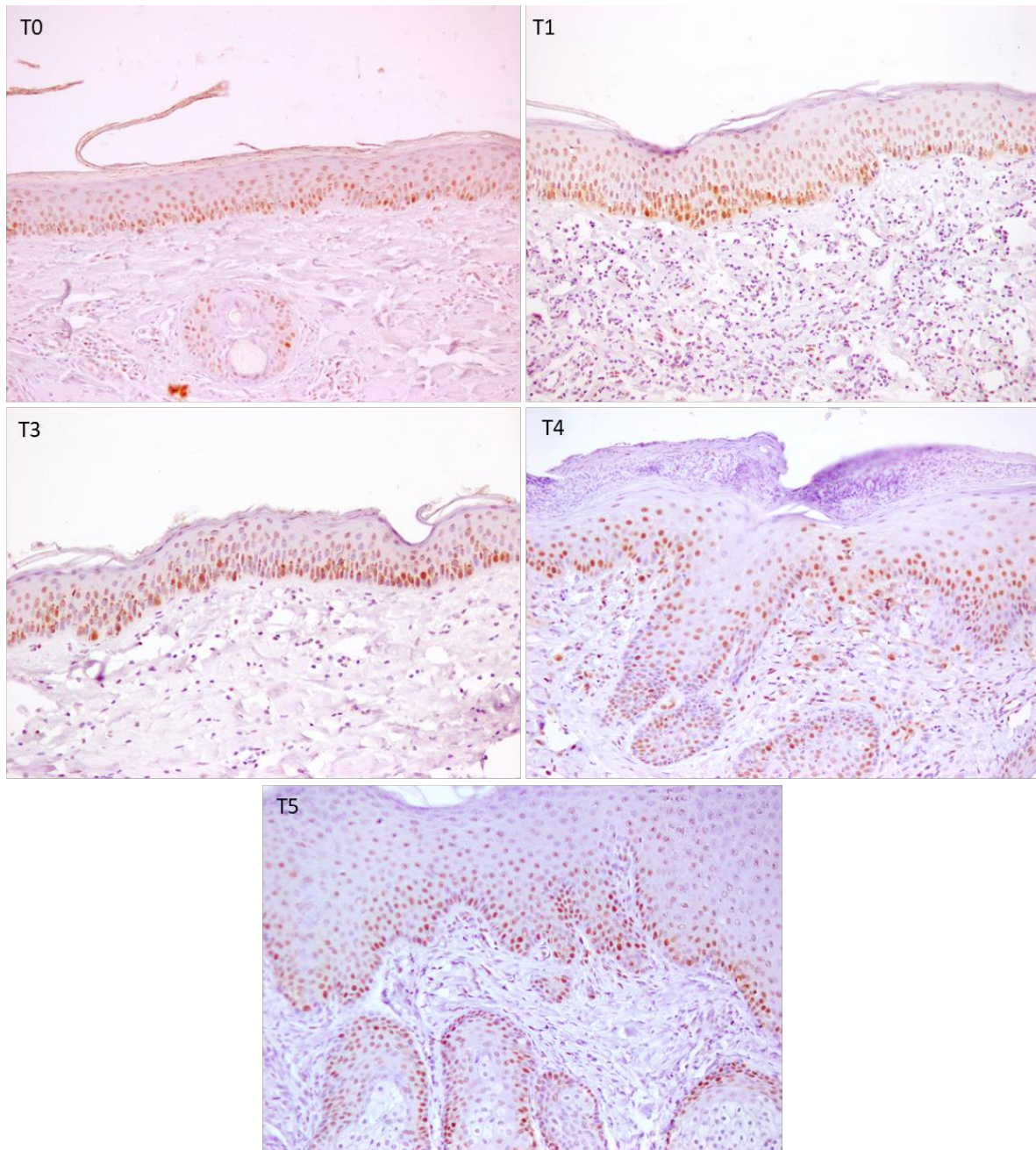


Figura. 13. Expresión del antígeno PCNA, por inmunohistoquímica en dermis. GT: grupo tratado. GC: Grupo de control. T0: 0 h. T1: 32 h después de la administración (p-a). T2: 72 h p-a. T3: 8 días p-a. T4: 15 días p-a. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

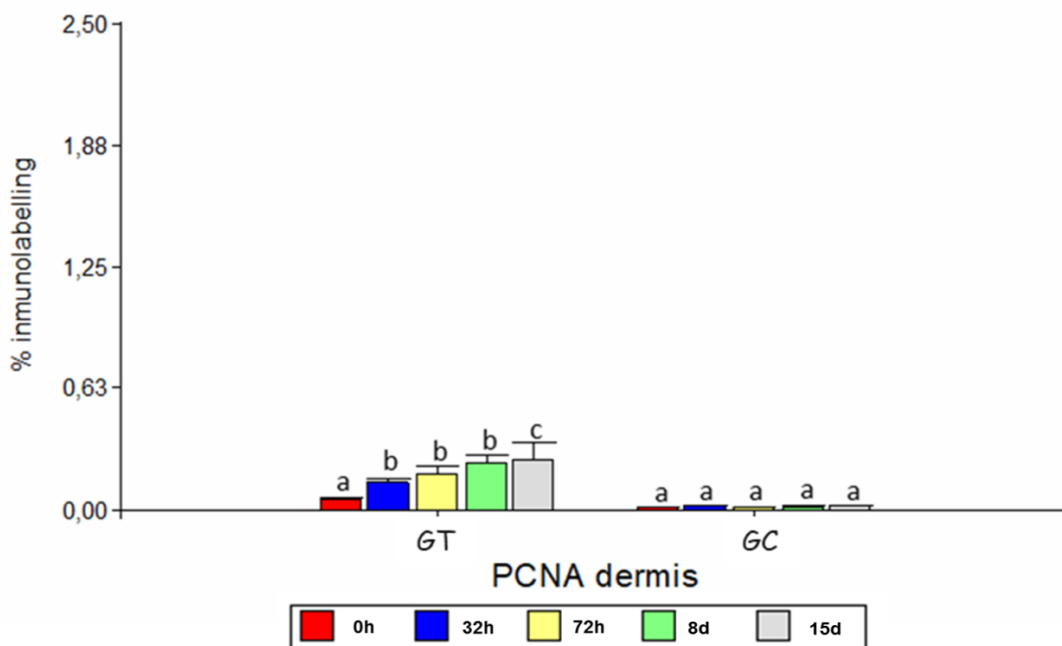


Figura. 14. Aspecto histopatológico de las biopsias de piel con PCNA 20X. Secuencia de lesiones observadas: T0= 0 h. T1= 32 h post administración (p-a). T2=72 h p-a. T3=8 días p-a. T4=15 días p-a.

La expresión de BCL2 y BAX a nivel epidérmico (Fig. 11 y 13) comenzó a observarse partir de las 32 h, permaneciendo hasta las 72 h. A este tiempo, el anti- BCL2 (Fig. 11) se mantiene constante, mientras que la expresión del anti-BAX disminuyó a la mitad (Fig. 13). Los valores de expresión de ambos anticuerpos disminuyeron significativamente a partir del día 8, alcanzando los niveles basales en el caso del anti-BAX, mientras que el anti-BCL2 logró los valores basales en el día 15. La expresión de ambas proteínas en distintos periodos de tiempo se muestra en los cortes histológicos de las Figs. 12 y 14. Como se observa en dichas imágenes la marcación es citoplasmática en el caso de BCL-2 y difusa para BAX a nivel epidérmico. Para evaluar el balance entre BAX y BCL2 se efectuó el cociente entre el % de inmuno-marcación entre

ambas proteínas (BAX/BCL-2). Dichos resultados se muestran en la figura 15, donde se observa que el cociente entre la inmuno-marcación BAX/BCL-2 se incrementa a las 32 h horas post administración.

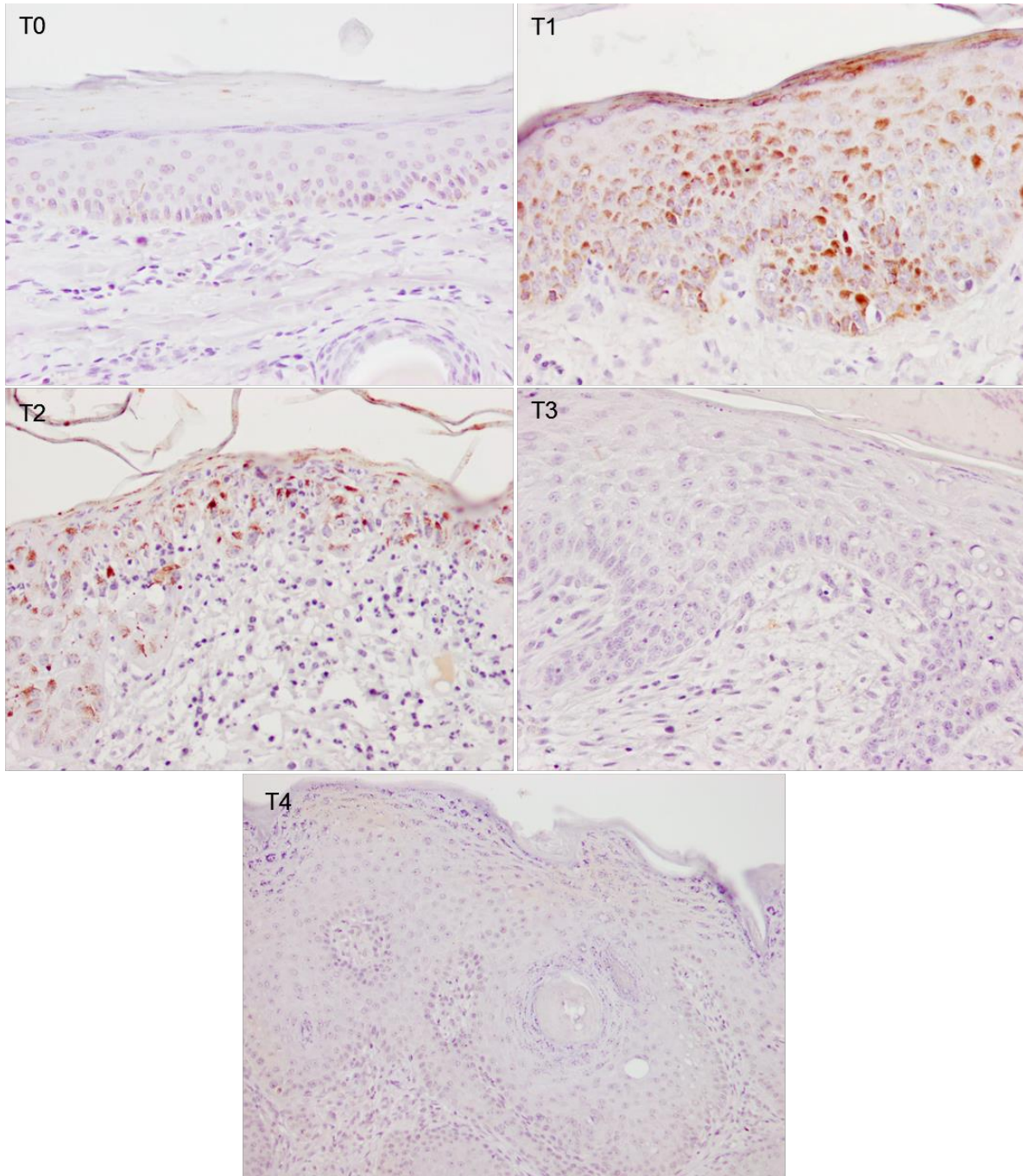


Figura.15.Aspecto histopatológico de las biopsias de piel con BCL2 40X. Secuencias de lesiones observadas: T0=0 h. T1=32 h post administración (p-a). T2= 72 h p-a. T3= 8 días p-a. T4=15 días p-a.

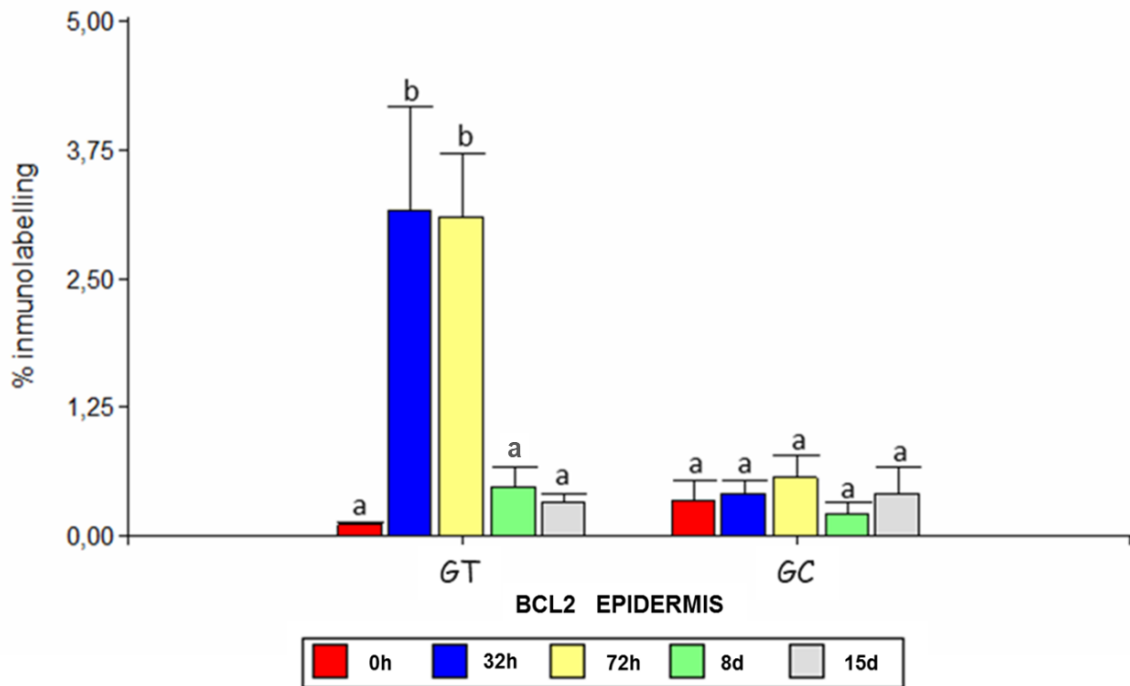


Figura. 16. Expresión del antígeno BCL2, por inmunohistoquímica en epidermis. GT: grupo tratado. GC: Grupo de control. T0= 0 h. T1= 32 h post administración (p-a). T2= 72 h p-a. T3= 8 días p-a. T4= 15 días p-a. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

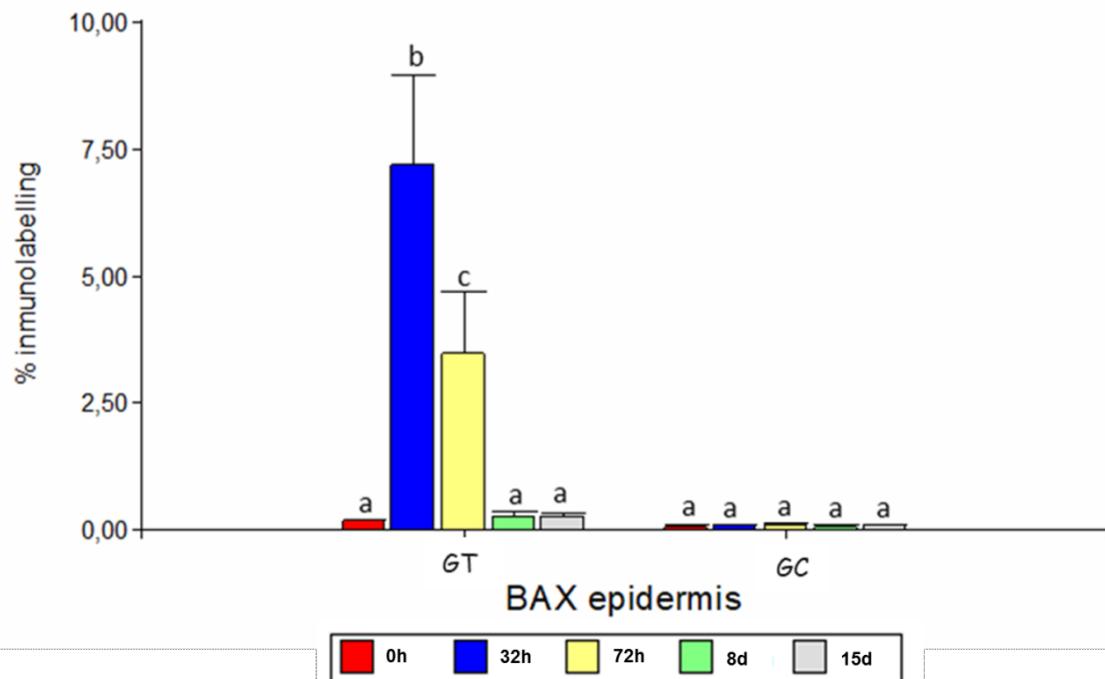


Figura.17. Expresión del antígeno BAX, por inmunohistoquímica en epidermis. GT: grupo tratado. GC: Grupo de control. T0= 0 h. T1= 32 h post administración (p-a). T2= 72 h p-a. T3= 8 días p-a. T4= 15 días p-a. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

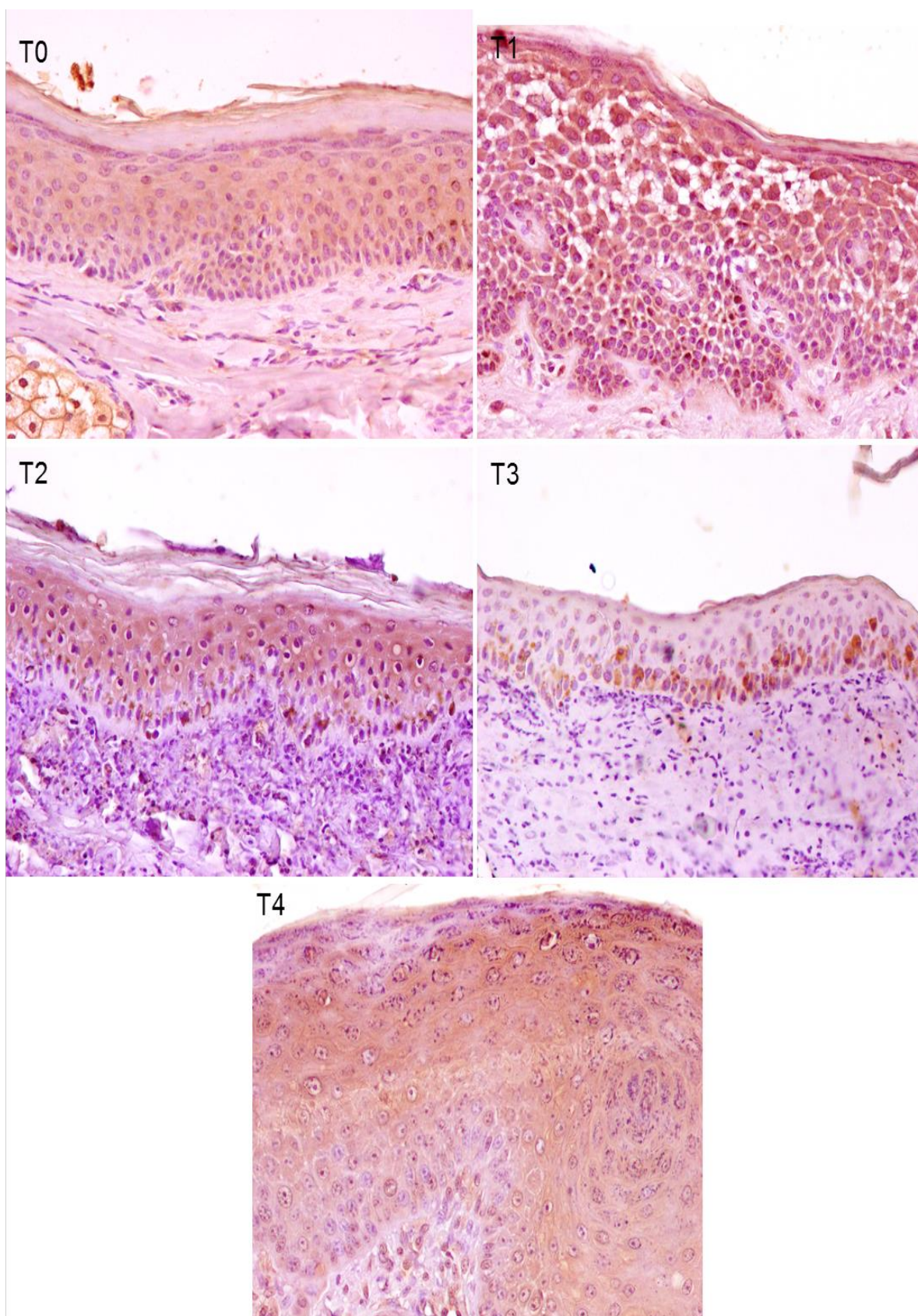


Figura. 18. Aspecto histopatológico de las biopsias de piel con BAX 20X. Secuencia de lesiones observadas: T0=0 h. T1=32 h post administración (p-a). T2= 72 h p-a. T3= 8 días p-a. T4= 15 días p-a.

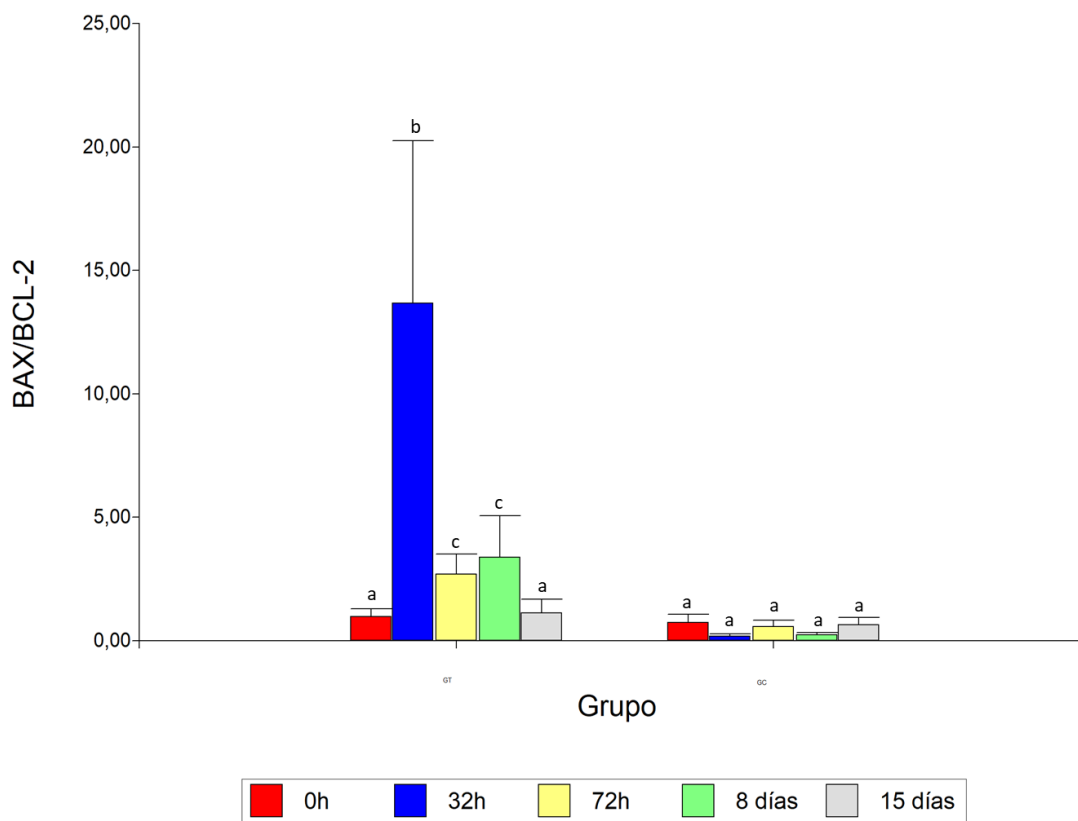


Figura. 19. Cociente entre los niveles de inmuno-marcación entre BAX y BCL-2 (BAX/BCL2). GT: grupo tratado. GC: Grupo de control. T0= 0 h. T1= 32 h post administración (p-a). T2= 72 h p-a. T3= 8 días p-a. T4= 15 días p-a. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

X-4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La fotosensibilización es un proceso común en animales domésticos que ha sido poco estudiado a nivel histopatológico. En este trabajo, se describen estos cambios secuenciales en cabras durante un período de 15 días. Según los registros bibliográficos no se cuenta con experimentos de este tipo, previamente realizados usando un agente de fotosensibilización. En términos generales, se suele definir a la lesión histopatológica producida por una sustancia fotosensibilizante como una dermatitis de interface necrotizante severa (Scott y col., 1979). Estas lesiones son coincidentes con las observadas

en este trabajo y son similares a las observadas en el daño solar directo en varias especies ([Mouldin y Kennedy, 2016](#)) e incluyen un escenario secuencial donde se observan cambios inflamatorios y necróticos en primera instancia, seguidos de hiperplasia epidérmica y neovascularización, y proliferación conjuntiva.

Los cambios agudos observados en este experimento entre las 32 h y las 72 h son similares a los de una dermatitis solar aguda grave ([Young, 2006](#), [Mouldin y Kennedy, 2016](#)). La aparición de queratinocitos apoptóticos compatibles con las "células de quemadura solar" fue más frecuente en esta etapa aunque se las observo durante todos los periodos muestreados ([Wojcinsky y col., 2013](#)). De este modo se puede inferir que el agente fotosensibilizador (AQs) fue capaz de aumentar el efecto de la radiación solar, ya que los animales de control no mostraron ningún cambio a lo largo del experimento bajo la misma exposición al sol. La mayoría de las lesiones observadas en el período comprendido entre 8 y 15 días en este trabajo son compatibles con lesiones observadas en elastosis solar y / o queratosis solar.

La elastosis solar se caracteriza por la desorganización de los componentes dérmicos y la aparición de fibras elásticas degeneradas basófilas dispersas o aglomeradas, gruesas e irregulares ([Mouldin y Kennedy, 2016](#)). Por otro lado, la queratosis solar se caracteriza por hiperplasia, espongiosis,

inflamación dérmica aguda y queratinocitos necróticos focales (Mouldin y Kennedy, 2016) y se considera una lesión cutánea precancerosa común en humanos, gatos y caballos. En el presente trabajo, no se observaron lesiones vasculares distintas a la hiperplasia de las células endoteliales. Sin embargo, trabajos previos se refieren a la degeneración fibrinoide de los vasos sanguíneos y la trombosis en la dermis superficial como un hallazgo característico de fotosensibilización (Scott y col., 1979; Ginn y col., 2007).

Nuestros resultados sugieren que el daño vascular no es una lesión primaria en la dermatitis por fotosensibilización. Tal vez, las lesiones observadas por Scott y col., (1979) puedan observarse en estadios crónicos de la entidad, influenciados por diferencias específicas de especie o por un efecto de la porfiria congénita, una enfermedad de fotosensibilización informada en ese estudio.

87

Varios cambios moleculares y celulares, incluyendo cambios en la actividad del ciclo celular, reparación celular, proliferación y apoptosis, ocurren en la piel como resultado de la radiación UV (Eström y col., 2001; Einspahr y col., 2006). En nuestro trabajo, el anticuerpo anti-PCNA, un marcador de proteína nuclear de la proliferación celular, se incrementó significativamente para todo el experimento en la capa epitelial del GT, un hecho que fue paralelo a la hiperplasia del epitelio (Figs. 9 y 10). En otro

experimento, en donde los ratones se irradiaron con luz UV, también mostraron un aumento de la proliferación celular en la epidermis (El-Abaseri y col., 2006).

En la piel, la muerte celular por apoptosis ha sido descrita en una amplia variedad de condiciones (Weedon, 1990; Raskin, 1997). Incluso, existe evidencia suficiente que indica que la apoptosis juega un importante rol en los mecanismos homeostáticos en la piel sana. Elmore (2007) sugirió que la diferenciación terminal de los queratinocitos es una forma especial de apoptosis, debido a la similitud entre estas células y las células apoptóticas. Ejemplo de esto son los signos de activación de endonucleasas y fragmentación del ADN que muestran los queratinocitos granulares. El control y la regulación de los eventos apoptóticos ocurren a través de los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (Cory y Adams, 2002). Estas proteínas controlan la permeabilidad de la membrana mitocondrial y pueden actuar promoviendo o inhibiendo la apoptosis (Galluzzi y col., 2011). Entre las proteínas antiapoptóticas podemos encontrar a Bcl-2 que inhiben la apoptosis al bloquear la activación de las proteasas caspasas (Newmeyer y col., 2000). BAX, por su parte, se comporta como pro-apoptótica ya que bloquea la capacidad de Bcl-2 para ejercer esta acción (Antonsson y Martinou, 2000). De este modo, la relación existente entre estas dos

proteínas es crucial en la regulación de la muerte celular por apoptosis. Así es que se ha observado que, la sobre-expresión de Bax con respecto a la expresión de BCL2, se asocia a una alta tasa de apoptosis (Lei y Davis, 2003; Teraki y Shiohara 1999; Zhan y col., 1994). En nuestro estudio, la relación entre inmuno-marcación BAX/BCL-2 en la epidermis fue máxima a las 32 h posteriores a la ingesta del agente de fotosensibilización, es decir, el período inmediatamente anterior a la observación de la necrosis tisular. Estudios experimentales demostraron la que radiación UV modifica la expresión de los marcadores p53 y BCL2 (Eström y col., 2001; Mass y col., 2003).

En conclusión, nuestros hallazgos son básicamente consistentes con los cambios en la piel descritos para el daño solar. Aunque los mecanismos fisiopatológicos entre la fotosensibilización y el daño solar directo muestran diferencias relevantes, la respuesta cutánea puede ser similar en ambos casos. Sin embargo, la fotosensibilización puede considerarse como una forma acelerada de daño directo de la piel, ya que el agente de fotosensibilización puede multiplicar el efecto de la radiación solar. Las lesiones secuenciales aquí descritas pueden ser un modelo de daño de la piel por fotosensibilización en cabras y probablemente en cualquier otro animal

doméstico, ya que los mecanismos de daño solar son compartidos por todas las especies.

X-5. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ ANTONSSON B y MARTINOU JC. (2000). The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* 256:50- 57.
- ✓ BANCROFT JD, STEVENS A. (1990). *Theory and Practice of Histological Techniques*. 3th Edition. Churchill, Livingstone, New York.
- ✓ CORY S y ADAMS JM. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*. 2:647-656.
- ✓ DI RIENZO JA, CASANOVES F, BALZARINI MG, GONZALEZ L, TABLADA M, ROBLEDO CW. (2008). InfoStat versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- ✓ EDSTRÖM DW, PORWIT A, ROS AM. 2001. Effects on human skin of repetitive ultraviolet-A1 (UVA1) irradiation and visible light. *Photodermatology Photoimmunology Photomedicine*, 17: 66- 70.
- ✓ EINSPAHR JG, XU MJ, WARNEKE J, SABODA K, RANGER- MOORE J, BOZZO P, DUCKETT L, GOLDMAN R, LIN P, BUCKMEIER J, ALBERTS DS. (2006). Reproducibility and expression of skin biomarkers in sun-damaged skin and actinic keratoses. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*; 15 (10): 1841-1848.
- ✓ EL-ABASERI TB, PUTTAS, HANSEN LA. (2006). Ultraviolet irradiation induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia through the activation of the epidermal growth factor receptor. *Carcinogenesis* 27: 225-231
- ✓ ELMORE S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicology Pathology*. 35:495-516.
- ✓ GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J.M.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V. DAWSON TM; DAWSON,V L;

EL-DEIRY WS; FULDA S; GOTTLIEB E; GREEN DR; HENGARTNER MO; KEPP O; KNIGHT RA; KUMAR S; LIPTON SA; LU X; MADEO F; MALORNI W; MEHLEN P; NUÑEZ G; PETER ME; PIACENTINI M; RUBINSZTEIN DC; SHI Y; SIMON HU; VANDENABEELE P; WHITE E; YUAN J; ZHIVOTOVSKY B; MELINO G; KROEMER G. (2011). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19:107-120.

- ✓ GIMENO EJ, MASSONE AR, PORTIANSKY EL. (2005). Introducción a las técnicas de inmunohistoquímica y aplicaciones en patología veterinaria. En: Manual del Decimoséptimo Curso Internacional de Posgrado en Técnicas de Inmunohistoquímica, Lectínhistoquímica y Microscopía Electrónica. Instituto de Patología Dr. B. Epstein y Servicio Central de Microscopía Electrónica Dr. S. I. Itagaki. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Pp 66-103.
- ✓ GINN PE, MANSELL EKLJ, RAKICH P. (2007). Skin and appendages. In: Grant Maxie, M (Eds). *Pathology of domestic animals*. Ed: Elsevier, Philadelphia. Pp. 620-627.
- ✓ LEI K, DAVIS RJ. (2003). JNK phosphorylation of Bim- related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 4 (100):2432-2437
- ✓ MASS P, HOFFMANN K, GAMBICHLER T, ALTMAYER P, MANNHERZ HG. (2003). Premature keratinocyte death and expression of marker proteins of apoptosis in human skin after UVB exposure. *Archive Dermatology Research*; 295: 71-79.

- ✓ MOULDIN EA, PETERS-KENNEDY J. (2016). Integumentary System. In: Grant Maxie M. Jubb, Kennedy and Palmers's Pathology of domestic animals. Ed. Elsevier. Sixth edition, Vol 1. Chapter 6. Pp 509-736
- ✓ NEWMAYER DD, BOSSY-WETZEL E, KLUCK RM, WOLF BB, BEERE HM, GREEN DR. (2000). Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. Cell Death Differ 7:402-407.
- ✓ NÚÑEZ-MONTOYA S, COMINI LR, SARMIENTO M, BECERRA C, ALBESA I, ARGÜELLO GA, CABRERA JL. (2005). Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: singlet oxygen and superoxide anion production. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology; 78: 77-83.
- ✓ NÚÑEZ-MONTOYA SC, COMINI LR, RUMIE-VITTAR B, FERNANDEZ IM, RIVAROLA VA, CABRERA JL. (2008). Phototoxic effects of *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). Toxicon, 51, 1409-1415.
- ✓ POLEFKA TG, MEYER TA, AGIN PP, BIANCHINI RJ. (2012). Effects of solar radiation on the skin. Journal of Cosmetic Dermatology; 11: 134-143
- ✓ PORTIANSKY EL. (2005a). Procesamiento y análisis de imágenes: de los ojos al microchip. 1.-Principios. En: Manual del Decimoséptimo Curso Internacional de Posgrado en Técnicas de Inmunohistoquímica, Lectínhistoquímica y Microscopía Electrónica. Instituto de Patología Dr. B. Epstein y Servicio Central de Microscopía Electrónica Dr. S. I. Itagaki. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Pp: 52-59.
- ✓ PORTIANSKY EL. (2005b). Procesamiento y análisis de imágenes: de los ojos al microchip. 2- Aplicación a la técnica colorimétricas/inmunocolorimétricas. En: Manual del Decimoséptimo Curso Internacional de Posgrado en Técnicas de Inmunohistoquímica,

Lectínhistoquímica y Microscopía Electrónica. Instituto de Patología Dr. B. Epstein y Servicio Central de Microscopía Electrónica Dr. S. I. Itagaki. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Pp: 60-65.

- ✓ RASKIN CA. (1997). Apoptosis and cutaneous biology. Journal of the American Academy of Dermatology. 36:885-896.
- ✓ SCOTT DW, MORT JD, TENNANT BC. (1979). Dermato histopathological changes in bovine congenital porphyria. The Cornell Veterinarian; 69: 145-158.
- ✓ TERAOKI Y, SHIOHARA T. (1999). Apoptosis and the skin. European Journal Dermatology, 9:413-425.
- ✓ WEEDON D. (1990). Apoptosis: its nature and implications for dermatopathology. American Journal of Dermatopathology. 1:133-144.
- ✓ WOJCINSKY ZW, ANDREW-JONES L, AIBO DI, DUNSTAN R. Phototoxic. 2013. In: Sahota PS, Popp JA, Hardisty JF, Gopinath C. Toxicologic Pathology: Nonclinical Safety Assessment. Ed. CRC Press. pp: 1015.
- ✓ YOUNG AR. (2006). Acute effects of UVR on human eyes and skin. Progress in Biophysics and Molecular Biology; 92: 80-85.
- ✓ ZHAN Q, FAN S, BAE I, GUILLOUF C, LIEBERMANN DA, O'CONNOR PM, FORNACE AJ. (1994). Induction of Bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. Oncogene. 9:3743-3751.

XI-ASPECTOS TOXICOCINÉTICOS DE LA INTOXICACIÓN POR *H. pustulata*.

XI-1. INTRODUCCIÓN.

Como se mencionó inicialmente, la toxicidad de *H. pustulata* se debe a la presencia de antraquinonas (AQs) capaces de inducir fotosensibilización (Núñez Montoya y col., 2008). Las AQs son metabolitos secundarios producidos por las plantas y tienen una gran diversidad de efectos biológicos (Vickery y Vickery, 1981). En *H. pustulata*, nueve AQs aglicones (soranjidiol, rubiadina, 1-metil éter de soranjidiol, 1-metil pter de rubiadina, damnacantal, damnacantol, 2-hiroxi-3-metil AQ, heterofillina, pustulina) y una biantraquinona (5,5'-bisoranjidiol) fueron identificados por Núñez Montoya y col. (2003 y 2006). Sin embargo, las dos más abundantes en las partes aéreas de la planta son soranjidiol y rubiadina (Núñez Montoya y col., 2003). Además, dichas antraquinonas, se destacan porque generan los niveles más altos de $^1\text{O}_2$ y/o $\text{O}_2^{\bullet-}$ bajo radiación (Núñez Montoya y col., 2005) y probaron tener acción fotosensibilizante en ratones inoculados experimentalmente (Núñez Montoya y col., 2008). El objetivo en este capítulo es describir variaciones en la concentración de AQs en sangre y piel de las cabras intoxicadas experimentalmente con *H. pustulata*.

XI-2. MATERIALES Y MÉTODOS.

a- Muestras biológicas a analizar.

Para el estudio toxicocinético se colectaron muestras de suero y piel de 3 animales tratados y un animal control, al azar. Las de suero se obtuvieron mediante venopunción yugular, mientras que las muestras de piel se tomaran siguiendo el procedimiento descrito para las muestras histológicas en el capítulo X. La primera muestra de suero como de piel se colectó en el tiempo 0 y se repitió a las 8-12-24-32-48-72 h, 8 y 15 días post-administración de la planta.

b- Determinación de antraquinonas en suero y tejidos.

La determinación cuali y cuantitativa de rubiadina y/o soranjidiol presente en todas las muestras de suero y tejido se llevó a cabo mediante HPLC-DAD-ESI-QTOF.

97

Los compuestos orgánicos no volátiles, en este caso las AQs, se extrajeron de las muestras de suero realizando una metodología modificada a partir de la descrita por Jackson (1979). Brevemente, cada muestra de suero (1 mL) se diluyó a la mitad con agua destilada (H₂O) y esta dilución se acidificó con HCl 0,1 N(0,5 mL) a pH \leq 2. Luego, se extrajo con éter etílico (5 mL en 4 veces). Las fracciones etéreas combinadas se evaporaron a presión reducida hasta sequedad en frascos previamente pesados. Se calculó el rendimiento de fracción etérea obtenida por pesada. Luego, cada muestra se disolvió con MeOH-HPLC (250µL en dos veces) en tubo Eppendorf. Se utilizó papel

Whatman N° 1 para filtrar cada muestra (sistema de microfiltración) antes de su análisis por HPLC, mediante la inyección de 40 µL.

Para extraer las AQs de las muestras de tejidos es necesario, en primer lugar, desintegrar el material biológico. Una vez pesada cada muestra, se cortaron con bisturí en trozos lo más pequeño posible (5 mm aprox.). Luego, cada muestra se malaxó con 1 mL de HCl 1 N (pH = 1) en un mortero, y se continuo el malaxado con el agregado de 1 mL de pepsina. Cada muestra se trasvasó a tubos de ensayo para ser sonicada durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, se diluyó con H₂O destilada hasta 20 mL, trasvasándose a Erlenmeyers (25 mL) y asegurándose de mantener el pH = 2. Se incubó a 37 °C durante 1 h en baño termostatzado con agitación para asegurar la desintegración del tejido. A continuación, se procede a la extracción de las AQs siguiendo procedimiento similar al citado en anteriormente. Se extrae con éter etílico (50 mL en 3 veces), las fracciones etéreas se juntan y evaporan a presión reducida en un frasco previamente pesado para calcular el peso de la fracción etérea. Se retoma con MeOH-HPLC (250 µL en dos veces) y se somete al sistema de microfiltración para su inyección en el HPLC (40 µL).

Para el análisis de HPLC-DAD-ESI-QTOF se empleó un Cromatógrafo Agilent Technologies 1200 Series system (Agilent, EEUU), que posee una bomba de gradiente (Agilent G1312B SL Binary), un desgasificador de solventes

(Agilent G1379 B) y un inyector automático (Agilent G1367 D SL + WP). Está conectado a un detector UV-Vis-DAD (Agilent G1315 C Satarlight), asociado a un espectrómetro de masa que posee una interfaz de ESI y un analizador de tiempo de vuelo MicroTOF Q II (Bruker Daltonics, USA) utilizado en modo espectroscopía de masa (del inglés MS: Mass Spectrometer) y MSⁿ.

La separación se realizó con la misma columna usada en el análisis HPLC-UV-Vis que trabajó a 25 °C con el mismo gradiente de elusión de la FM, formada también como en el caso anterior de dos soluciones: A) ácido fórmico (HFO) 0,16 M en agua MiliQ y B) HFO 0,16 M en MeOH-HPLC. El detector se ajustó a 269, 362 y 410 nm, con un barrido entre 200 y 800 nm. Se usó N₂ como gas nebulizador de secado y argón como gas de colisión, ambos a 4,0 bar, 8,0 L/min respectivamente, 180 °C y 4500 V de tensión capilar. Los espectros de masas se registraron en modo de iones negativos (50 a 1000 m/z), y la detección de MSⁿ se programó para detectar los tres iones más abundantes con una energía de colisión de 10,0 eV (Transfer time: 50 - Collision RF: 300 - Pre pulse storage: 1 μs). Como calibrante interno se empleó una solución de formiato de sodio con una concentración de 40 mM, disuelto en una mezcla isopropanol-H₂O (50:50), la cual se inyectó entre 60-61 min a un volumen de 40 μL (loop 20 μL). El Software Compass Version 3.1 se usó para la adquisición de datos, los

cuales se procesaron con el software Data Analysis Version 4.1 (Bruker Daltonics GmbH, EEUU).

c- Análisis estadístico

El análisis de varianza no paramétrico se utilizó para establecer diferencias en la concentración de AQs en el GT en los distintos momentos de muestreo. El test de DGC se usó como método de determinación de la significación. Las diferencias significativas se definieron como aquellas cuyo error estándar sea $< 0,05$. Para estos análisis se empleó el software estadístico INFO STAT (Di Rienzo y col., 2008).

XI-3. RESULTADOS

100

Los resultados de la determinación de AQs (Tabla 4) arrojó niveles significativos de rubiadina, soranjidiol, 1-metil éter de rubiadina, 2-hidroxi-3-metil antraquinona y bisoranjidiol entre los 8 y las 72 h post administración (p-a) de la planta en el suero de cabras intoxicadas (GT). Sólo en un animal, se detectaron trazas de AQ con posterioridad a las 72 h y hasta las 360 h p-a. En las muestras de pieles no se registraron niveles detectables para ninguna de las AQs buscadas.

En la Fig. 15., se puede observar la variación de los porcentajes de AQs totales, expresados en como rubiadina/soranjidiol, detectadas en suero de los

animales tratados, en función del tiempo. Los niveles de AQs comienzan a detectarse a las 8 h p-a, alcanzando valores significativos entre las 24y 72 h después de la administración oral del material vegetal.

Aprovechando el análisis de HPLC-DAD-ESI-QTOF, se investigó la presencia de filoteritina en las muestras de suero de cabras tratadas y de control. En ninguno de los sueros, se detectó esta sustancia característica de la fotosensibilización hepática, especialmente en las muestras que coinciden con la aparición de los signos clínicos (entre 8 y 72 h p-a).

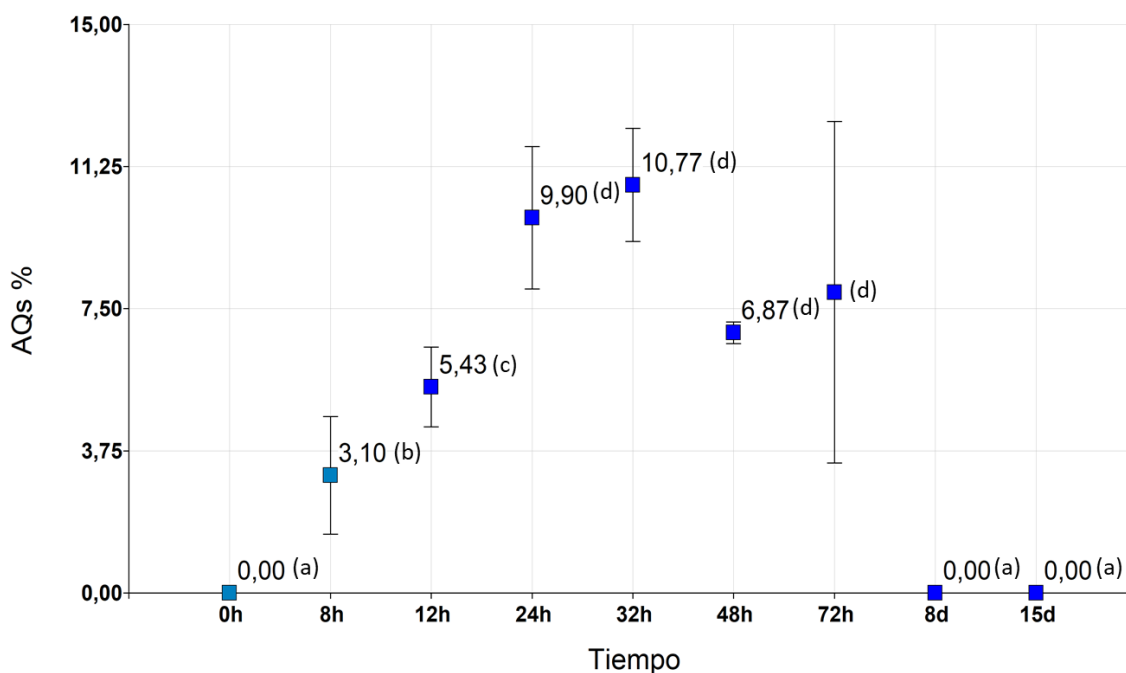


Figura. 20. Variación en la concentración de rubiadina/soranjidiol (%) durante los distintos tiempos de muestreo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 5-Detección de antraquinonas en suero y piel de cabras intoxicadas con *H. pustulata*.

	Animal	Muestra	Tiempo (h)								
			0	8	12	24	32	48	72	192	360
GC	1	Suero	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Piel	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GT	1	Suero	ND	ND	Sor (5,1%) Bisor (trazas)	Rub/Sor (13,6%)	Rub/Sor (11,5%)	Rub/Sor (7,2%)	ND	ND	ND
		Piel	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2	Suero	ND	Rub/Sor (3,2%) 1-MeRub (1,3%)	Rub/Sor (3,8)	Rub/Sor (7,5%)	Rub/Sor (7,9%)	Rub/Sor (7,1%)	Rub/Sor (8,2%) Bisor (trazas)	ND	ND
		Piel	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3	Suero	ND	Rub/Sor (4,8%)	Rub/Sor (7,4%)	Rub/Sor (8,6%)	Rub/Sor (3,5%) 1-MeRub (5,9%) 2-OH-3-Me-AQ (3,5%)	Rub/Sor (6,3%)	Rub/Sor (15,6%) Bisor (trazas)	1- MeRub (trazas)	Rub/Sor (trazas)
		Piel	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ND: No se detectó AQs. Rub: Rubiadina Bisor: Bisoranjidiol 1-MeRub: 1-metil éter de rubiadina Sor: Soranjidiol 2-OH-3-Me-AQ: 2-hidroxi-3-metil antraquinona											

XI-4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Las plantas fototóxicas pueden causar daño a la piel a través de dos rutas diferentes, ya sea por ingestión o por contacto directo (Peter y col., 2013), produciendo generalmente dermatitis. Este efecto fototóxico puede tener origen en daño hepático, que impide la correcta metabolización de la filoteritina. A este tipo de fotosensibilización se la define como fotosensibilización secundaria (con daño hepático) o primaria (sin daño hepático).

Según los resultados de esta tesis (ensayos clínico-patológicos y dermato-patológicos, capítulos IX y X respectivamente), la administración oral de hojas y tallos finos de *H. pustulata* fue capaz de inducir fototoxicidad primaria. Y a su vez, concuerda con la detección de las principales AQs de esta planta en suero de los animales tratados con ella, las cuales han demostrado poseer acción fotodinámica Tipo 1 (generación de $O_2^{\bullet-}$) y Tipo 2 (producción de 1O_2) (Núñez-Montoya y col., 2005; Comini y col., 2007). En concordancia con nuestros resultados, Nuñez-Montoya y col. (2008) lograron reproducir experimentalmente la intoxicación al administrar oralmente en ratones, una fracción que contenía mayoritariamente rubiadina y soranjidiol, principales AQs de *H. pustulata* (Nuñez-Montoya y col., 2008). Debido a que

estas AQs han demostrado ser altamente liposolubles (Comini y col., 2006), es dable esperar que tengan una buena capacidad de absorción a nivel gastrointestinal. En el experimento puede observarse la rapidez con la que se absorbieron, ya que a las 8 h post administración, las cabras del GT presentaron niveles detectables de rubiadina y soranjidiol. La mayor concentración de rubiadina/soranjidiol se observó entre las 24 y 72 h, período de tiempo donde los signos clínicos fueron más evidentes como se describe en el primer capítulo. Entre las 192 y 360 h post administración, solo una de las cabras analizadas presentó trazas detectables de AQs en suero, momento en que los signos clínicos de fotofobia y prurito son despreciables.

En general, una vez que el compuesto fototóxico se encuentra en el órgano diana, en este caso la piel, se visualizan los signos clínicos (dermatitis); por lo tanto, es esperable que las AQs o sus metabolitos se acumulen en los tejidos. Así, en el caso de los ratones intoxicados con una fracción de AQs (rubiadina y soranjidiol), proveniente de *H. pustulata*, se comprobó su presencia en la piel de los mismos (Núñez Montoya y col., 2008). Lamentablemente en nuestro estudio, no se logró la determinación de AQs en piel de cabras (GT), en todos los momentos muestreados. Esto puede deberse

a que los niveles cutáneos estén por debajo de los límites de detección de la técnica empleada, o a que exista algún tipo de metabolización de las AQs. En este último caso podrían ocurrir cambios químicos de dichas sustancias que las conviertan en metabolitos secundarios biológicamente activos. Para confirmar esto, otros estudios serían necesarios. Sin embargo, suponemos que la dosis de material vegetal que se utilizó para inducir la fototoxicidad contenía una cantidad insuficiente de AQs para poder ser detectadas en piel. Esto se basa en que la dosis de AQs que se utilizó para inducir fototoxicidad en ratones fue de 1,36 mg/Kg de peso vivo (Núñez Montoya y col., 2008), mientras que en nuestro experimento la dosis de AQs administrada fue de 42,25 µg/kg.

Finalmente, el hecho de que no se haya detectado filoeitrina en las muestras de suero (animales experimentales y de control) confirma que *H. pustulata* no induce un daño hepático suficiente para elevar los niveles de este pigmento fotosensibilizante endógeno. Esto corrobora lo mencionado en el capítulo IX y lo postulado por Hansen y Martiarena en los primeros trabajos sobre la toxicidad de *H. pustulata* (1968).

XI-5. BIBLIOGRAFÍA.

- ✓ ALI SM, OLIVO M. (2002) Bio-distribution and subcellular localization of hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. *Int J Oncology*.; 21: 531-540.
- ✓ COMINI LR, NÚÑEZ MONTOYA SC, ARGÜELLO GA, CABRERA JL. (2006) Determinación del coeficiente de partición (logP) para derivados antraquinónicos aislados de *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiáceas). *Latin American Journal of Pharmacy*; 25: 252-255.
- ✓ COMINI LR, NÚÑEZ-MONTOYA SC, SARMIENTO M, CABRERA JC, ARGÜELLO GA. (2007). Characterizing some photophysical, photochemical and photobiological properties of photosensitizing anthraquinones. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 188:185-91.
- ✓ DI RIENZO JA, CASANOVES F, BALZARINI MG, GONZALEZ L, TABLADA M, ROBLEDO CW. (2008). InfoStat versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- ✓ GALANOU MC, THEODOSSIOU TA, TSIOURVAS D, SIDERATOU Z, PALEOS CM. (2008) Interactive transport, subcellular relocation and enhanced phototoxicity of hypericin encapsulated in guanidinylated liposomes via molecular recognition. *Photochem Photobiol.*; 84:1073-1083.
- ✓ JACKSON JV. (1978). Extraction methods in toxicology. In: Carke EGC (Ed) and Berle, Isolation and Identification of Drugs in

- pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material. The Pharmaceutical Press, London. pp: 16-30.
- ✓ NÚÑEZ-MONTOYA S.C., AGNESE A., PÉREZ C., TIRABOSCHI I., CABRERA J.L. (2003). Pharmacological and toxicological activity of *Heterophyllaea pustulata* anthraquinone extracts. *Phytomedicine*, 10: 569-74.
 - ✓ NÚÑEZ-MONTOYA SC, AGNESE A, CABRERA JL. (2006). Anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata*. *Journal of Natural Products*, 69:801-3.
 - ✓ NÚÑEZ-MONTOYA SC, COMINI LR, RUMIE-VITTAR B, FERNANDEZ IM, RIVAROLA VA, CABRERA JL. (2008). Phototoxic effects of *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *Toxicon*, 51: 1409-1415.
 - ✓ NÚÑEZ-MONTOYA SC, COMINI LR, SARMIENTO M, BECERRA C, ALBESA I, ARGÜELLO GA, CABRERA JL. (2005). Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: singlet oxygen and superoxide anion production. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 78:77-83.
 - ✓ PETER PFU, QINGSU XIA, YUEWEI ZHAO, SHUGUANG W, HONGTAO YU, HSIU-MEI CH. (2013). Phototoxicity of Herbal Plants and Herbal Products, *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, 31:3, 213-255, DOI: 10.1080/10590501.2013.824206.
 - ✓ RITZ R, ROSER F, RADOMSKI N, STRAUSS WS, TATAGIBA M, GHARABAGHI A. (2008). Subcellular colocalization of hypericin with

respect to endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in glioblastoma cells. *Anticancer Res.* 28:2033-2038.

- ✓ SIBONI G, WEITMAN H, FREEMAN D, MAZUR Y, MALIK Z, EHRENBURG B. (2002). The correlation between hydrophilicity of hypericins and helianthrone: internalization mechanisms, subcellular distribution and photodynamic action in colon carcinoma cells. *Photochem Photobiol Sci.* 1:483-491.
- ✓ THEODOSSIOU T, SPIROMD, JACOBSON J, HOTHERSALL JS, MACROBERT AJ. (2004). Evidence for intracellular aggregation of hypericin and the impact on its photocytotoxicity in PAM 212 murine keratinocytes. *Photochem Photobiol*; 80:438-443
- ✓ UZDENSKY AB, MA LW, IANI V, HJORTLAND GO, STEEN HB, MOAN J. (2001). Intracellular localization of hypericin in human glioblastoma and carcinoma cell lines. *Lasers Med Sci.*; 16:276-283.
- ✓ VICKERY BL y VICKERY B. (1981). *Secondary Plant Metabolism*, pp. 1-17. The Macmillan Press, Hong Kong.

XII-CONCLUSIONES GENERALES

109

1. El presente trabajo constituye el primer estudio experimental de la toxicidad de *H. pustulata* en cabras. La dosis de 5 gramos de material vegetal seco (hojas y tallos finos) molido de la planta, administrada en una única dosis, fue suficiente para inducir la intoxicación.
2. La dosis oral administrada de AQ expresada como rubiadina fue de 42.25 µg/kg; prácticamente 31 veces menos que la empleada en ratones, lo cual demuestra la elevada sensibilidad de esta especie a esta intoxicación.
3. El cuadro clínico observado fue comparable al mencionado para otras plantas fotosensibilizantes y se inicia rápidamente (24-72 h) tras la administración de la planta junto con la exposición a la radiación solar. Las antraquinonas son esenciales en la patogénesis de la intoxicación, ya que los signos clínicos fueron más severos en los momentos en donde la concentración de antraquinonas en sangre fue más alta.
4. Se puede observar leve aumento de la enzima GOT durante los primeros 5 días post administración, como resultado del severo daño tisular observado. Esto corresponde con las sutiles lesiones degenerativas identificadas en las biopsias hepáticas colectadas al octavo día de transcurrida la intoxicación.
5. Al inicio, la fotosensibilización se caracteriza por una serie de cambios degenerativos que afectan principalmente a la capa espinosa de la epidermis que incluye espongiosis, acantólisis difusa y formación

de vesículas intraepidérmicas. Luego el cuadro progresa y se identifica una dermatitis de interface necrotizante severa.

6. La mayoría de las lesiones observadas en este trabajo, especialmente en el período comprendido entre 8 y 15 días, son compatibles con lesiones observadas en elastosis solar y/o queratosis solar.

7. Los patrones de proliferación y apoptosis celular mostraron severas variaciones en corto período de tiempo. La apoptosis fue máxima entre las 32 y 72 h post intoxicación, mientras que la proliferación lo fue entre los 8 y 15 días.

8. Todos estos hallazgos sugieren que la fotosensibilización puede considerarse como una forma acelerada de daño directo de la piel, ya que el agente de fotosensibilización puede multiplicar el efecto de la radiación solar.

XIII- Trabajos y publicaciones logradas.

Publicaciones en revistas especializadas

1. **Micheloud JF**, Colque-Caro LA, Comini LR, Cabrera JL, Núñez-Montoya S, Martinez OG, Gimeno EJ: Spontaneous photosensitization by *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiaceae), in sheep from Northwestern Argentina. TROPICAL ANIMAL HEALTH AND PRODUCTION 07/2017; DOI:10.1007/s11250-017-1354-0.
2. **Micheloud JF**; Aguirre LS, Marioni J, Mugas ML, Cabrera JL, Martinez OG, Gallardo SC, Gimeno EJ, Núñez-Montoya SC. Experimental poisoning by *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiaceae) in goats. Clinical, biochemical and toxicological aspects. TOXICON; 2019; <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.04.015>.
3. **Micheloud JF**, Luján LL, Colque-Caro LA, Núñez-Montoya SC, Suárez VH, Porstiansky EL, Gimeno EJ. Sequential cutaneous pathology of experimental photosensitization by *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiaceae) in goats. 2019. Enviado a: VET PATH.

112

Presentaciones realizadas en reuniones científicas.

1. **Micheloud JF**, Colque Caro LA, Flores F, Alonso MJ, Martinez O, Cabrera JL, Nuñez-Montoya SC, Gimeno EJ: Intoxicación por *Heterophyllaea pustulata* en ovinos: Descripción de un brote. 9no seminario Davis Salta 2015.; 09/2015.
2. **Micheloud JF**, Colque-Caro LA, Marioni J, Cabrera JL, Gimeno EJ, Núñez-Montoya SC. Experimental Poisoning by *Heterophyllaea pustulata* in goats: clinical, biochemical and pathologic aspects. Primer

Congreso Regional de Toxicología Veterinaria. Facultad de Veterinaria
- Universidad de la República. 7-8 de diciembre de 2017. Montevideo,
Uruguay.

3. **Micheloud JF**, Gallardo SC, Núñez-Montoya S, Martínez OG, Gimeno EJ. Intoxicación por *Heterophyllaea pustulata* en vacas de cría en el Noroeste Argentino. Descripción de un brote. XI Reunión Argentina de Patología Veterinaria; 08/2018.
4. **Micheloud JF**, Luján LL, Núñez-Montoya SC, Suárez VH, Portiansky EL, Gimeno EJ. Dermatopathology in goats with photosensitization in goats by *Heterophyllaea pustulata*. Sequential histopathological study. XI Reunión Argentina de Patología Veterinaria; 08/2018. (Selección para presentación oral).

